

**Molekularbiologische Charakterisierung
Shiga Toxin 1-konvertierender Bakteriophagen und
des phagenkodierten Typ III Effektorproteins NleA₄₇₉₅**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt
der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Kristina Creuzburg
Diplom-Biologin
geboren am 22.04.1978 in Dresden

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Gerold Barth
Prof. Dr. rer. nat. Herbert Schmidt
Prof. Dr. rer. nat. Helge Karch

Eingereicht am: 09.01.2007

Tag der Disputation: 24.05.2007

Die vorliegende Arbeit wurde von März 2003 bis März 2005 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden und von April 2005 bis Oktober 2006 im Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim in Stuttgart unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Schmidt angefertigt. Finanziell wurde diese Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogrammes 1407 (DFG Schm 1360/1-3) unterstützt.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Zusammenfassung	III
Summary	V
1. Einleitung	1
1.1. Enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>	1
1.2. Epidemiologie Shiga Toxin-produzierender <i>E. coli</i>	2
1.2.1. Reservoir	2
1.2.2. Übertragungswege	3
1.2.3. Infektionsdosis und Krankheitsverlauf von EHEC-Infektionen	5
1.2.4. Therapie und präventive Maßnahmen	6
1.3. Pathogenitätsfaktoren der STEC	9
1.3.1. Shiga Toxine und Shiga Toxin-konvertierende Bakteriophagen	9
1.3.2. „Cytolethal Distending Toxin V“	13
1.3.3. Plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren	13
1.3.3.1. Enterohämolysin	14
1.3.3.2. Serinprotease	14
1.3.3.3. Katalase-Peroxidase	15
1.3.3.4. Metalloprotease	15
1.3.3.5. Subtilase Zytotoxin	15
1.3.4. Chromosomale Pathogenitätsinseln	16
1.3.4.1. „Locus of Enterocyte Effacement“	17
1.3.4.1.1. genetische Organisation	17
1.3.4.1.2. Regulation	18
1.3.5. Aufbau und Funktion des Typ III Sekretionssystems	19
1.3.6. Außerhalb des LEE kodierte Effektorproteine	23
1.3.6.1. „Cycle Inhibiting Factor“	24
1.3.6.2. „Tir Cytoskeleton Coupling Protein“	24
1.3.6.3. <i>E. coli</i> sekretiertes Protein J	25
1.3.6.4. Nicht-LEE-kodierter Effektor A	25
2. Ziele der Arbeit	26
3. Material und Methoden	27
3.1. Material	27

3.1.1. Chemikalien	27
3.1.2. Enzyme und Desoxynukleotidtriphosphate	27
3.1.3. Größenstandards	27
3.1.4. Antikörper zur Western Blot Analyse	28
3.1.5. Oligonukleotide	28
3.1.6. <i>E. coli</i> Stämme	29
3.1.7. Plasmide und Cosmide	29
3.1.8. Medien	31
3.1.9. Antibiotika	32
3.2. Methoden	32
3.2.1. Kulturtechnische Arbeitsmethoden	32
3.2.1.1. Kultivierung von Bakterien	32
3.2.1.2. Kultivierung von Bakterien unter T3SS-induzierenden Bedingungen	33
3.2.1.3. Konservierung von Bakterien	33
3.2.1.4. Präparation von Phagenlysat	33
3.2.1.5. Transduktion und Plaquetest	34
3.2.1.6. Infektion eukaryotischer Zellen und Detektion translozierter Proteine durch Immunfluoreszenz	34
3.2.2. Gentechnische Arbeitsmethoden	36
3.2.2.1. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	36
3.2.2.2. Restriktionsspaltungen der DNA	36
3.2.2.3. Reinigung von DNA-Fragmenten	36
3.2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
3.2.2.5. Präparation von Cosmiden und Plasmiden	43
3.2.2.6. Präparation genomischer DNA	43
3.2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten	44
3.2.2.8. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation modifiziert nach Hanahan (1983)	45
3.2.2.9. Herstellung elektrokompeter Zellen und Transformation durch Elektroporation	45
3.2.2.10. Deletion und Markierung chromosomaler Gene nach Datsenko und Wanner (2000)	46
3.2.2.11. DNA-Sequenzierung	47

3.2.2.12. Sequenz-Identifikationsnummer	49
3.2.2.13. Southern-Blot Hybridisierung	49
3.2.3. Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	50
3.2.3.1. Proteinfällung mit Trichloressigsäure	50
3.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.2.3.3. Western Blot Analyse und immunologische Detektion der Proteine	51
3.2.4. Bioinformatik	53
4. Ergebnisse	54
4.1. Charakterisierung der Stx1-konvertierenden Bakteriophagen CP-1639 und BP-4795	54
4.1.1. Sequenzanalyse von CP-1639 und BP-4795	54
4.1.2. Bestimmung der „Attachment Sites“ von CP-1639 und BP-4795	57
4.1.3. Charakterisierung des integrativen Elementes des <i>E. coli</i> O111:H ⁻ Stammes 1639/77	59
4.2. Charakterisierung des Proteins NleA ₄₇₉₅	65
4.2.1. Sequenzvergleich des BP-4795 phagenkodierten Proteins NleA ₄₇₉₅	65
4.2.2. Herstellung einer Δ <i>escN</i> - Deletionsmutante	67
4.2.3. Typ III Sekretionssystem-abhängiger Transport von NleA ₄₇₉₅	68
4.2.4. Verringerte NleA ₄₇₉₅ -Expression bei inaktivem Typ III Sekretionssystem	73
4.2.5. Translokation von NleA ₄₇₉₅ in eukaryotische Zellen	75
4.3. Verbreitung und genetische Charakterisierung der <i>nleA</i> -Familie	77
4.3.1. Verbreitung des Gens <i>nleA</i> innerhalb pathogener <i>E. coli</i>	77
4.3.2. Restriktionsanalyse von <i>nleA</i> zur Identifikation verschiedener Varianten	79
4.3.3. DNA-Sequenzanalyse von <i>nleA</i> -Varianten pathogener <i>E. coli</i> Stämme	81
4.3.4. Bestimmung der Kopienzahl von <i>nleA</i> im Genom von STEC und EPEC	93
4.3.5. Horizontaler Gentransfer des Gens <i>nleA</i>	96
4.4. Bioinformatische Analyse von NleA ₄₇₉₅	98
5. Diskussion	100
6. Literaturverzeichnis	112
7. Anhang	143

Abkürzungsverzeichnis

A/E	Attaching and Effacing
<i>amp^R</i>	Ampicillinresistenz
APS	Ammoniumperoxodisulfat
as	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
C-Terminus	Carboxy-Terminus
<i>cam^R</i>	Chloramphenicolresistenz
cuo	cluster of unknown origin
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
DIG	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHEC	enterohämorrhagische <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogene <i>E. coli</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
FKS	fötales Kälberserum
FRT	FLP recognition target
HA	Hämagglutinin-Epitop des humanen Influenzavirus
HC	hämorrhagische Colitis
HUS	hämolytisch-urämisches Syndrom
<i>kan^R</i>	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
MDa	Megadalton
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NleA	nicht-LEE kodierter Effektor A (Protein)
<i>nleA</i>	nicht-LEE kodierter Effektor A (Gen)

N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
ORF	offener Leserahmen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBE	Plauebildende Einheiten
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PBS-T	PBS mit Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss	Einzelstrang
STEC	Shiga Toxin-produzierende <i>E. coli</i>
Stx	Shiga Toxin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
T3SS	Typ III Sekretionssystem
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFB	Transformationspuffer
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid

Zusammenfassung

Shiga Toxin (Stx)-konvertierende Bakteriophagen besitzen eine konservierte lambdoide Genomstruktur, weisen aber ein hohes Maß an genetischer Diversität auf. Aus diesem Grund wurden die bereits vorhandenen Sequenzdaten der Stx1-Phagen CP-1639 des *Escherichia coli* O111:H⁻ Stammes 1639/77 und BP-4795 des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97 vervollständigt und analysiert. Im Gegensatz zu dem induzierbaren Bakteriophagen BP-4795 fehlen CP-1639 einige Gene, die für den lytischen Lebenszyklus eines Bakteriophagen notwendig sind. Daher handelt es sich bei CP-1639 um einen kryptischen Prophagen, der nicht mehr in der Lage ist das Wirtschromosom zu verlassen und intakte Phagenpartikel zu bilden. Die Integrationsstellen wurden innerhalb des Gens *yehV* für BP-4795 und *ssrA* für CP-1639 bestimmt. In unmittelbarer Umgebung des Integrationsortes von CP-1639 befindet sich ein eigenständiges integratives Element. Dieses besteht aus drei offenen Leserahmen unbekannter Herkunft, sowie einem Integrasegen und kann auch ohne Assoziation mit Phagen-DNA auftreten.

Phagen können zusätzlich zu ihrem Genom Gene bakteriellen Ursprungs tragen. Diese können unter anderem infolge von Transpositionen oder einer unkorrekten Exzision der Phagen-DNA aus dem Wirtschromosom während des lytischen Lebenszyklus in das betreffende Phagengenom eingebaut werden. Eines solches Gen des Bakteriophagen BP-4795 kodiert das Typ III Effektorprotein NleA₄₇₉₅, dessen Funktionalität nach dem C-terminalen Einbau von neun Codons des Hämagglutinin (HA)-Epitopes des humanen Influenzavirus in die Sequenz des Gens *nleA*₄₇₉₅ überprüft wurde. Dies erfolgte unter Verwendung der Western Blot Analyse durch die Expression dieses Fusionsproteins in dem Wildtyp-Stamm 4795/97 und in der Deletionsmutante 4795Δ*escN* des Stammes 4795/97. Die Typ III Sekretionssystem (T3SS)-inaktive Mutante 4795Δ*escN* wurde im Verlauf dieser Arbeit hergestellt. Diese Untersuchungen zeigten ebenfalls, dass zur Sekretion von NleA₄₇₉₅ ein intaktes T3SS notwendig ist. Weiterhin zeigte die Infektion einer HeLa-Zelllinie mit NleA₄₇₉₅-HA exprimierenden Bakterienstämmen und die anschließende Analyse mit Hilfe der Immunfluoreszenz, die Translokation des Proteins in eukaryotische Wirtszellen. Darüber hinaus deuten die Ergebnisse dieser Untersuchung auf eine Lokalisation von NleA₄₇₉₅-HA innerhalb des Trans-Golgi Netzwerkes hin.

Die Verbreitung des Gens *nleA* wurde in insgesamt 170 Shiga Toxin-produzierenden *E. coli* und enteropathogenen *E. coli* Stämmen untersucht. Dies führte zur Identifikation von 14 verschiedenen Varianten des Gens *nleA* in 149 der überprüften Stämme, wobei mit Ausnahme von zwei Isolaten ebenfalls ein Markergen des T3SS nachgewiesen werden konnte. Neben drei bereits bekannten Varianten konnten elf neue Varianten identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen sich zu 71% bis 96% glichen. Sequenzunterschiede traten insbesondere aufgrund der Deletion oder Insertion von vier bis 51 Aminosäuren im Mittelteil der potentiellen Proteine auf. Weiterhin deuten die Ergebnisse dieser Untersuchungen eine Assoziation bestimmter Varianten des Gens *nleA* mit spezifischen *E. coli* Serogruppen an. Southern-Blot Hybridisierungen zeigten, dass etwa ein Viertel der *nleA*-positiven Stämme zwei Kopien dieses Gens in ihrem Genom tragen. Hierbei handelt es sich meist um zwei verschiedene Varianten. In fast allen Fällen kodiert eine dieser Varianten, aufgrund einer Punktmutation oder Insertion eines IS-Elementes, ein verkürztes und vermutlich nicht funktionelles Protein. Mit Hilfe von Transduktionsexperimenten konnten verschiedene Varianten des Gens *nleA* im Genom induzierbarer Phagen nachgewiesen werden, was auf eine Verbreitung des Gens *nleA* durch horizontalen Gentransfer hinweist.

Summary

Although Shiga toxin (Stx)-converting bacteriophages share a conserved lambdoid genetic structure they exhibit a large extent of mosaicism. Hence, the sequence data of the Stx1-phages CP-1639 of *Escherichia coli* O111:H⁻ strain 1639/77 and BP-4795 of *E. coli* O84:H4 strain 4795/97 were completed and analyzed. In contrast to the inducible bacteriophage BP-4795, some genes are lacking in the genome of CP-1639, which are necessary for the lytic phage life cycle. Therefore, the cryptic prophage CP-1639 is not able to form intact phage particles. Phage BP-4795 integrates into the gene *yehV* and for CP-1639 an attachment site could be detected within *ssrA*. An independent integrative element is located in the immediate vicinity of CP-1639. This element consists of three open reading frames of unknown origin as well as an integrase-encoding gene and it also occurs without association of phage-DNA.

Phages can harbor additional genes of bacterial origin. Amongst others, such genes could be acquired as a result of transpositions or during the lytic phage life cycle as a consequence of the incorrect excision of the phage core genome from the chromosome of the host. One such gene of bacteriophage BP-4795 encodes the type III effector protein NleA₄₇₉₅, whose functionality was determined after the C-terminal linkage of the sequence of nine codons of the hemagglutinin (HA)-epitope of the human influenza virus to the gene *nleA*₄₇₉₅. The expression of the recombinant protein in the wild-type strain 4795/97 and the generated type III secretion system (T3SS) deficient deletion mutant 4795Δ*escN* of the strain 4795/97 was analyzed by Western blotting. These studies also demonstrated the need of an intact T3SS for the secretion of NleA₄₇₉₅. Furthermore, HeLa cells were infected with NleA₄₇₉₅-HA expressing bacteria strains and analyzed by immunofluorescence. By this investigation, the translocation of NleA₄₇₉₅-HA into eukaryotic host cells could be shown. Moreover, the results indicate a localization of this protein within the trans-Golgi network.

The distribution of the gene *nleA* was determined in 170 Shiga toxin-producing *E. coli* and enteropathogenic *E. coli* strains. Fourteen different variants of the gene *nleA* were detected in 149 strains and with the exception of two isolates they also harbored a marker gene of the T3SS. Beside three known variants, 11 new variants could be identified, which show an identity between 71% and 96% at the deduced amino acid sequence level, particularly because of the deletion or insertion of 4 to 51

amino acids in the middle of the putative protein. Moreover, the results of this study indicate an association of certain *nleA*-variants and specific *E. coli* serogroups. Southern-blot hybridization showed, that about a quarter of the *nleA*-positive isolates harbor two copies of this gene in their genome. Mostly, the respective strains carry two different variants and one of these encodes a truncated and probably disrupted protein because of one point mutation or the insertion of an IS-element. By transduction experiments, different variants of the gene *nleA* could be detected in the genome of inducible phages. This indicates the distribution of the gene *nleA* by horizontal gene transfer.

1. Einleitung

1.1. Enterohämorrhagische *Escherichia coli*

Enterohämorrhagische *E. coli* (EHEC) wurden erstmals 1982 mit einer Lebensmittelinfektion durch ungenügend gegartes Fleisch in Verbindung gebracht. Riley *et al.* (1983) untersuchten in den USA zwei Ausbrüche blutiger Durchfallerkrankungen, die infolge des Verzehrs von *E. coli* O157:H7 kontaminierten Hamburgern auftraten. Dieser Serotyp war zuvor in den USA nur 1975 als humanpathogener Erreger einer hämorrhagischen Colitis (HC) beschrieben worden (Riley *et al.*, 1983). Ebenfalls 1983 berichteten Karmali *et al.* (1983b) von dem Auftreten sporadischer Fälle des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS) in Zusammenhang mit Zytotoxin-produzierenden *E. coli* Stämmen. Dieses, erstmals von Konowalchuk *et al.* (1977) beschriebene Toxin wirkte zytotoxisch auf Verozellen (Nierenzellen der grünen afrikanischen Meerkatze) und HeLa-Zellen (humane Zellen eines Zervixkarzinoms) (Konowalchuk *et al.*, 1977; O'Brien *et al.*, 1983b). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass dieses Toxin strukturell und in seiner biologischen Aktivität dem Shiga Toxin von *Shigella dysenteriae* Typ1 ähnelt (O'Brien und LaVeck, 1983; O'Brien *et al.*, 1983a; O'Brien *et al.*, 1983b). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurden die Namen Verotoxin (VT) und Shiga-like Toxin (SLT) eingeführt. Infolge einer Neuregelung der Nomenklatur wird mittlerweile überwiegend die Bezeichnung Shiga Toxin (Stx) verwendet (Calderwood *et al.*, 1996). Synonym existieren die Bezeichnungen VTEC (Verotoxin-produzierende *E. coli*) und STEC (Shiga Toxin-produzierende *E. coli*) für *E. coli* Stämme, die ein oder mehrere Shiga Toxine bilden.

Bereits 1983 assoziierten Karmali *et al.* (1983a) Shiga Toxin als gemeinsamen Virulenzfaktor einer STEC-Infektion und der Ausbildung einer hämorrhagischen Colitis oder eines hämolytisch-urämischen Syndroms. Allerdings haben nachfolgende Studien gezeigt, dass die Stx-Expression allein nicht in jedem Fall eine Erkrankung auslöst, sondern weitere Pathogenitätsfaktoren vorliegen müssen. Dies führte zur Definition des Pathovars der enterohämorrhagischen *E. coli*. Diese Untergruppe der STEC umfasst alle humanpathogenen Stämme, die eine hämorrhagische Colitis oder ein hämolytisch-urämisches Syndrom verursachen, Shiga Toxin produzieren, sogenannte „Attaching and Effacing“ (A/E)-Läsionen an Epithelzellen ausbilden und ein ca. 60 MDa großes Plasmid besitzen, das weitere Virulenzfaktoren kodiert (Levine *et al.*, 1987; Nataro und Kaper, 1998). Darüber hinaus existieren atypische EHEC-

Stämme, die das Plasmid nicht besitzen und/oder keine A/E-Läsionen ausbilden können.

Aufgrund der spezifischen Kombination von Lipopolysaccharid (O)- und Flagellen (H)-Oberflächenantigenen werden *E. coli* Isolate verschiedenen Serotypen zugeordnet. Das O-Antigen gibt weiterhin die Serogruppe an, von denen derzeit 181 für *E. coli* beschrieben sind (Stenutz *et al.*, 2006). Bis heute ist O157:H7 der bedeutendste EHEC-Serotyp, allerdings gewinnen zunehmend auch humanpathogene nicht-O157 STEC an Bedeutung (Karch *et al.*, 2005). So werden besonders *E. coli* der Serogruppen O26, O103, O111 und O145 als Erreger von HC bzw. HUS isoliert (Griffin und Tauxe, 1991; Beutin *et al.*, 2004; Brooks *et al.*, 2005; Karch *et al.*, 2005; Robert Koch Institut, 2006).

1.2. Epidemiologie Shiga Toxin-produzierender *E. coli*

1.2.1. Reservoir

Als Hauptreservoir der STEC werden landwirtschaftliche Nutztiere, insbesondere Rinder, angesehen (Orskov *et al.*, 1987; Nataro und Kaper, 1998; Caprioli *et al.*, 2005). Weiterhin können STEC bei anderen Wiederkäuern wie Schafen, Ziegen (Zschock *et al.*, 2000; Cobeljic *et al.*, 2005), Wasserbüffeln (Caprioli *et al.*, 2005) und Hirschen (Renter *et al.*, 2001) nachgewiesen werden. Seltener werden STEC bei Säugetieren isoliert, die nicht zur Unterordnung der Wiederkäuer gehören. So wurde ihr Vorkommen bei Schweinen (Beutin *et al.*, 1993; Cobeljic *et al.*, 2005), Pferden (Trevena *et al.*, 1996; Chalmers *et al.*, 1997), Hunden (Trevena *et al.*, 1996; Sancak *et al.*, 2004), Katzen (Beutin *et al.*, 1993), Kaninchen (Pritchard *et al.*, 2001; Garcia und Fox, 2003) und Ratten (Nielsen *et al.*, 2004) beschrieben. Oftmals ist nicht geklärt, ob es sich bei diesen Tierarten um ein natürliches Reservoir oder nur einen vorübergehenden Träger von STEC handelt. Darüber hinaus können Vögel diese Erreger verbreiten. Es gibt Berichte über den Nachweis dieser Bakterien bei Hausgeflügel, wie Hühnern (Cobeljic *et al.*, 2005), Enten (Leclercq und Mahillon, 2003) und Truthähnen (Heuvelink *et al.*, 1999), sowie bei Wildvögeln wie Tauben (Dell'Omo *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2000), Möwen (Wallace *et al.*, 1997; Makino *et al.*, 2000), Kanadagänsen (Kullas *et al.*, 2002) und Staren (Nielsen *et al.*, 2004). STEC sind ebenfalls aus Insekten wie Stubenfliegen (Iwasa *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999; Alam und Zurek, 2004) oder Mistkäfern (Xu *et al.*, 2003) isolierbar.

Meist sind Tiere asymptomatische Träger dieser Bakterien. In einigen Fällen können sie bei Kälbern oder auch Katzen und Hunden Diarrhöe auslösen (Paton und Paton, 1998; Sancak *et al.*, 2004). Nur bei Schweinen verursachen STEC die schwerwiegende Ödemkrankheit mit neurologischen Symptomen wie Ataxie, Krämpfen und Lähmungserscheinungen, sowie Ödemen in Augenlidern, Gehirn, Magen und Darm (MacLeod *et al.*, 1991; Paton und Paton, 1998).

1.2.2. Übertragungswege

Gegenwärtig gelten die Übertragung Shiga Toxin-produzierender *E. coli* durch kontaminierte Lebensmittel bzw. Wasser, von Mensch zu Mensch und von Tier zu Mensch als die drei wesentlichen Infektionswege mit diesen Erregern.

Laut einer Studie von Rangel *et al.* (2005) wurden 350 gemeldete *E. coli* O157-Ausbrüche in dem Zeitraum von 1982-2002 in den USA in 52% der Fälle durch kontaminierte Lebensmittel, in 14% durch Schmierinfektionen, in 6% bzw. 3% durch kontaminiertes Bade- oder Trinkwasser und in 3% der Fälle durch Tierkontakt verursacht. Bei 21% der Krankheitsfälle ist der Übertragungsweg unbekannt.

Die Mehrzahl der Lebensmittelinfektionen wird durch den Verzehr kontaminierter Nahrungsmittel bovinen Ursprunges hervorgerufen. Vor allem unzureichend gegartes Rindfleisch wie Roast Beef und Rinderhackfleisch, hauptsächlich als Bestandteil von Hamburgern, gelten als Risikofaktor (Bell *et al.*, 1994; Rangel *et al.*, 2005; Rodrigue *et al.*, 1995), aber auch Salami (Tilden, Jr. *et al.*, 1996), Rohmilch (Allerberger *et al.*, 2003) und Rohmilchkäse (Honish *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist eine Infektion durch nicht-bovine tierische Lebensmittel möglich. Diese kann zum Beispiel durch rohe Ziegenmilch (McIntyre *et al.*, 2002), Ziegenkäse (Espie *et al.*, 2006), Hirschfleisch (Keene *et al.*, 1997) und Mettwurst (Paton *et al.*, 1996) hervorgerufen werden. Da Nutzvieh ein Reservoir der STEC darstellt, besteht die Gefahr der Kontamination solcher Lebensmittelerzeugnisse durch Exkremente bzw. den Darminhalt dieser Tiere während des Schlachtprozesses, der Fleischverarbeitung oder auch der Milchgewinnung. So konnte in einer von Doyle und Schoeni (1987) durchgeführten Untersuchung *E. coli* O157 bei im Handel erhältlichen Rind- (3,7%), Schweine- (1,5%), Geflügel- (1,5%) und Lammfleischprodukten (2,0%) nachgewiesen werden. Im Zuge einer weiteren Studie wurden nicht-O157 STEC in Rind- (23%), Schweine- (18%), Lamm- (48%), Kalb- (63%), Hühner- (12%) und Truthahnfleisch (7%), sowie

in Fisch (10%) und Schalentieren (5%) aus verschiedenen Lebensmittelgeschäften gefunden (Samadpour *et al.*, 1994). Bedingt durch die Fähigkeit der STEC in Fäkalien mehrere Wochen überleben zu können (Wang *et al.*, 1996), ist eine Übertragung auch durch rohes Obst und Gemüse, das während des Anbaus oder der Verarbeitung fäkal kontaminiert wurde, möglich. So führte der Verzehr von Blattsalat (Ackers *et al.*, 1998; Hilborn *et al.*, 1999), Rettichsprossen (Michino *et al.*, 1999), Alfalfasprossen (Breuer *et al.*, 2001; Ferguson *et al.*, 2005) oder unpasteurisiertem Apfelsaft bzw. Apfelwein (Besser *et al.*, 1993; Cody *et al.*, 1999) zu größeren STEC-Ausbrüchen. Als Infektionsquellen gelten ferner Trinkwasser und Badegewässer, aufgrund einer möglichen tierischen oder humanen fäkalen Kontamination (Keene *et al.*, 1994; Feldman *et al.*, 2002; Olsen *et al.*, 2002) und der Fähigkeit der STEC zur mehrwöchigen Persistenz in Wasser, insbesondere bei niedrigen Temperaturen (Wang und Doyle, 1998). So kam es zu Erkrankungen durch verunreinigtes Trinkwasser (Swerdlow *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 2002), sowie durch die Aufnahme kontaminierten Wassers in Schwimmbecken (Brewster *et al.*, 1994) oder Seen (Keene *et al.*, 1994; Bruce *et al.*, 2003).

Weiterhin besteht die Möglichkeit einer Schmierinfektion mit STEC durch die Übertragung von Mensch zu Mensch aufgrund unzureichender Hygienemaßnahmen. Dies kann zu Ausbrüchen zwischen Familienmitgliedern (Ludwig *et al.*, 2002), in Kindergärten (Belongia *et al.*, 1993), Krankenhäusern (Weightman und Kirby, 2000) oder Pflegeheimen (Carter *et al.*, 1987) führen.

Auch eine Übertragung von Tier zu Mensch ist möglich. Durch diesen Infektionsweg sind insbesondere Kinder bei Vernachlässigung der Hygiene gefährdet (Chapman *et al.*, 2000). Aufgrund der über zehnmonatigen Persistenz von STEC in der Umwelt (Varma *et al.*, 2003) kann die Aufnahme durch indirekten Tierkontakt über fäkal kontaminierte Böden in der Umgebung von Viehbeständen (Grif *et al.*, 2005), auch lange Zeit nach der Beweidung von öffentlich zugänglichen Flächen, erfolgen (Crampin *et al.*, 1999). Allerdings gilt vor allem der direkte Kontakt mit STEC-tragenden Wiederkäuern in landwirtschaftlichen Betrieben (Milne *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2004) und in Streichelzoos (Heuvelink *et al.*, 2002; David *et al.*, 2004) als Risikofaktor.

1.2.3. Infektionsdosis und Krankheitsverlauf von EHEC-Infektionen

Vergleichbar mit der Infektiosität von Shigellen wird für eine EHEC-Erkrankung in der Literatur eine geringe Infektionsdosis von 100 bis 200 Bakterien angegeben (Nataro und Kaper, 1998). In einer von Strachan *et al.* (2005) durchgeführten Studie wurden Infektionsdosen von 14 bis 10000 Organismen bei verschiedenen Lebensmittel- und Umweltassoziierten EHEC-Ausbrüchen berechnet. Die geringe Infektionsdosis kann unter anderem mit der hohen Toleranz von STEC gegenüber Säurestress erklärt werden. *E. coli* besitzen drei verschiedene Säureresistenz-Systeme, die es ihnen ermöglichen pH-Werte von 1,5 bis 2,5, wie sie im menschlichen Magen vorherrschen, zu überleben (Foster, 2004).

Neben einem asymptomatischen Verlauf einer STEC-Infektion beträgt die Inkubationszeit zur Ausbildung EHEC-assoziiierter Krankheitsbilder normalerweise drei bis fünf Tage. Symptome einer Erkrankung können ebenso bereits nach einem oder erst nach acht Tagen auftreten. Für ein bis drei Tage zu Beginn der Erkrankung zeigen Patienten typischerweise wässrige Durchfälle, begleitet von abdominalen Krämpfen und Erbrechen. Fieber tritt dagegen selten auf. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es bei ca. 90% der Fälle zu wässrig-blutigen Durchfällen. Dieses Krankheitsbild weist Ähnlichkeit zu der von Shigellen verursachten Ruhr auf. Darüber hinaus tritt bei 10 bis 20% der Erkrankten die schwere Verlaufsform der hämorrhagischen Colitis mit blutigem Stuhl und starken abdominalen Schmerzen auf. Etwa 15% der Patienten, besonders Kinder unter 10 Jahren, entwickeln ein bis zwei Wochen nach Krankheitsbeginn das hämolytisch-urämische Syndrom, eine extraintestinale Komplikation. Das Erscheinungsbild des HUS ist durch mikroangiopathische hämolytische Anämie, Thrombozytopenie und akutes Nierenversagen gekennzeichnet. Der Verlauf des HUS kann von einem leichteren Grad bis zu einer schweren Komplikation, bei der verschiedene Organe wie Darm, Herz, Lunge, Bauchspeicheldrüse und zentrales Nervensystem betroffen sind, variieren. Die Letalität des HUS, besonders im Kindesalter und für ältere Menschen, wird in der Literatur mit weniger als 10% angegeben. Des weiteren kann HUS nach einem irreversiblen Nierenversagen zu einer lebenslangen Dialysepflicht führen oder eine Transplantation erfordern. Als weitere Spätfolgen können Diabetes mellitus, neurologische Veränderungen, Dickdarmverengungen oder Bluthochdruck auftreten. Vor allem Säuglinge, Kleinkinder, ältere Menschen und immunsupprimierte Personen sind von den schwerwiegenderen

Krankheitsverläufen einer EHEC-Infektion betroffen (Ochoa und Cleary, 2003; Karmali, 2004; Karch *et al.*, 2005; Tarr *et al.*, 2005; Razzaq, 2006).

Allgemein wird in der Literatur für STEC eine mittlere Ausscheidungsdauer von bis zu drei Wochen aufgeführt (Galanis *et al.*, 2003). Jedoch kann sie, insbesondere bei Kleinkindern, bis zu 124 Tagen andauern (Karch *et al.*, 1995).

Als weiteres, wenn auch selteneres, Krankheitsbild einer EHEC-Infektion wurde die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP) angesehen. TTP ist durch Thrombozytopenie, Hautblutungen, hämolytische Anämie und neurologische Veränderungen gekennzeichnet. Neueren Erkenntnissen zufolge handelt es sich bei den ähnlichen Erscheinungsbildern einer EHEC-Infektion und einer TTP allerdings um verschiedene Pathogenitätsmechanismen. Wichtigstes Kriterium ist die Aktivität der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease ADAMTS13. Bei einer TTP liegt eine verminderte Aktivität von ADAMTS13 vor, während bei einer EHEC-Infektion diese Aktivität überwiegend ein normales Niveau aufweist. Patienten eines EHEC-verursachten HUS und verminderter ADAMTS13-Aktivität, aufgrund einer Mutation im verantwortlichen Gen, können eine Prädisposition für die Ausbildung einer TTP besitzen, die dann im Zuge der Infektion durch EHEC zum Ausbruch kommen kann (Besbas *et al.*, 2006; Tsai, 2006).

1.2.4. Therapie und präventive Maßnahmen

Gegenwärtig steht keine ursächliche Therapie zur Behandlung von EHEC-Infektionen zur Verfügung. Daher kann die Behandlung einer EHEC-Erkrankung nur symptomatisch erfolgen, bei der insbesondere die Kontrolle des Flüssigkeit- und Elektrolythaushaltes notwendig ist. Zu Therapiezwecken werden eine forcierte Diurese, bei Niereninsuffizienz eine Hämo- oder Peritonealdialyse, sowie in einigen Fällen Bluttransfusionen und Plasmatherapien angewendet (Tarr *et al.*, 2005).

Der therapeutische Einsatz von Antibiotika ist bis heute kontrovers. Zum einen liegen keine klinischen Studien vor, die einen kürzeren Krankheitsverlauf einer durch EHEC hervorgerufenen Diarrhöe bestätigen (Panos *et al.*, 2006). Zum anderen weisen einige Untersuchungen auf eine Verhinderung des HUS nach Einsatz bestimmter Antibiotika zu Beginn der Infektion (Ikeda *et al.*, 1999) bzw. auf ein erhöhtes Risiko an HUS zu erkranken nach Einnahme von Antibiotika hin (Wong *et al.*, 2000). Bei Wachstum von STEC in Gegenwart verschiedener Antibiotika *in vitro* konnte eine

verstärkte Shiga Toxin-Freisetzung, die das Risiko einer HUS-Erkrankung erhöht, nachgewiesen werden (Kimmitt *et al.*, 2000). Aufgrund des Mangels an Daten von ausreichend abgesicherten Studien wird empfohlen auf eine Antibiotikatherapie bei EHEC-Infektionen zu verzichten (Thorpe, 2004).

Gegenwärtig konzentriert sich die Entwicklung neuer Therapeutika zur Inaktivierung von Shiga Toxinen im Darm auf drei Gebiete. Diese umfassen synthetische Toxin-bindende Substanzen, rekombinante, probiotische Bakterien zur Toxin Bindung und gegen Shiga Toxin gerichtete monoklonale Antikörper (MacConnachie und Todd, 2004). So wurden verschiedene synthetische Analoga des Shiga Toxin Rezeptors Globotriaosylceramid (Gb3), wie Synsorb-Pk, STARFISH oder Gb3 Polymere, entwickelt. Für Synsorb-Pk, bestehend aus dem kovalent an eine silikonbasierte Matrix gebundenen Trisaccharidteil des Gb3 Rezeptors, konnte allerdings in einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie keine Verminderung schwerwiegender Krankheitssymptome bei HUS-Patienten festgestellt werden (Trachtman *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu muss die Effizienz der Präparate STARFISH, ein oligovalenter, wasserlöslicher Kohlenhydrat-Ligand (Kitov *et al.*, 2000), und Gb3 Polymere, bestehend aus einer Serie linearer Acrylamid-Polymere mit verschiedenen Trisaccharid-Anteilen des Gb3 Rezeptors (Watanabe *et al.*, 2004), die eine wesentlich höhere Bindungskapazität für Stx1 und Stx2 als Synsorb-Pk aufweisen, noch in einer klinischen Studie getestet werden. Ein möglicher neuer Therapieansatz könnte die Infusion von zusätzlichem Serum Amyloid P (SAP), einem humanen Plasmaprotein, sein, das im Tierversuch Mäuse vor der Toxizität von Stx2 schützte (Armstrong *et al.*, 2006). Ebenfalls für Therapie Zwecke wurden verschiedene rekombinante, probiotische Bakterien generiert. Diese exprimieren auf ihrer Zelloberfläche ein modifiziertes Lipopolysaccharid, das dem Gb3 Rezeptor ähnelt und somit eine Zielstruktur zur Bindung von Shiga Toxin darstellt (Paton *et al.*, 2000). Der ursprünglich von Paton *et al.* (2000) erzeugte rekombinante *E. coli* Stamm ist allerdings für den klinischen Einsatz nicht geeignet, da es sich um einen Resistenzplasmid-tragenden, pathogenen Stamm handelt. Dieses Problem wurde durch die Herstellung eines sicheren Thymin-auxotrophen *E. coli* Laborstammes gelöst, der die genetische Information zur Ausbildung der Rezeptorstruktur zusammen mit einem Thyminkodierenden Gen auf einem Plasmid trägt (Pinyon *et al.*, 2004). Ein weiterer Ansatz ist die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen verschiedene Untereinheiten von Shiga Toxin (Mukherjee *et al.*, 2002a; Mukherjee *et al.*, 2002b; Smith *et al.*, 2006;

Wen *et al.*, 2006). Allerdings liegen auch bei dieser Therapieform noch keine Ergebnisse einer klinischen Studie vor.

Da es sich bei EHEC-Erkrankungen vor allem um Lebensmittelinfektionen handelt, gilt die strikte Einhaltung von Hygienevorschriften im Umgang mit Nahrungsmitteln als präventive Maßnahme. In der Industrie zielen während der Gewinnung, der Verarbeitung, der Lagerung, dem Transport und dem Verkauf von Lebensmitteln die betriebliche Eigenkontrolle, die Einhaltung produktspezifischer Hygienebestimmungen und Maßnahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung, wie Betriebskontrollen, Probennahmen und die Anwendung gesetzlicher Bestimmungen auf die Minimierung des Infektionsrisikos ab. Des weiteren dürfen gemäß Infektionsschutzgesetz keine Personen unter EHEC-Verdacht Tätigkeiten in Gemeinschaftseinrichtungen ausüben. Verbraucher, insbesondere Kleinkinder, ältere Menschen, immunsupprimierte Personen und Schwangere sollten Lebensmittel tierischer Herkunft nur gut durchgegart verzehren oder Nahrungsmittel zu sich nehmen, die einem anderen Bakterien abtötenden Verfahren unterzogen wurden. Auch ist auf die Einhaltung der Lagervorschriften und die entsprechende Hygiene bei der Zubereitung zu achten. Zur Vermeidung von Schmierinfektionen sollten Kleinkinder nur unter der Aufsicht Erwachsener Kontakt zu Nutztierarten haben und die Möglichkeit einer anschließenden gründlichen Reinigung der Hände sollte gegeben sein. Auch bei dem Umgang mit Patienten einer EHEC-Erkrankung sollten Hygienemaßnahmen strikt eingehalten werden.

Entsprechend des deutschen Infektionsschutzgesetzes sind der Krankheitsverdacht, die Erkrankung oder der Tod an HUS, sowie der Nachweis von EHEC meldepflichtig.

1.3. Pathogenitätsfaktoren der STEC

1.3.1. Shiga Toxine und Shiga Toxin-konvertierende Bakteriophagen

Shiga Toxine verursachen aufgrund ihrer sehr potenten Zytotoxizität schwerwiegende Krankheitssymptome und gelten daher als Hauptvirulenzfaktor der STEC. Basierend auf der serologischen Variabilität und Sequenzunterschieden von *stx*, werden Shiga Toxine in die zwei Hauptgruppen Stx1 und Stx2 eingeteilt (Caprioli *et al.*, 2005). Stx1, das eine nahezu identische Sequenz zu dem Toxin von *S. dysenteriae* Typ1 aufweist, umfasst die Varianten Stx1, Stx1c (Zhang *et al.*, 2002a) und Stx1d (Burk *et al.*, 2003). Stx2, das weniger als 60% Übereinstimmung zu Stx1 auf Aminosäureebene aufweist, bildet eine heterogenere Gruppe und beinhaltet neben Stx2 die Varianten Stx2c (Schmitt *et al.*, 1991), Stx2c2 (Jelacic *et al.*, 2003), Stx2d (Melton-Celsa *et al.*, 1996), Stx2e (Weinstein *et al.*, 1988), Stx2f (Schmidt *et al.*, 2000) und Stx2g (Leung *et al.*, 2003). STEC können entweder nur die genetische Information für eine Stx-Variante oder für Stx1 und Stx2-Varianten in Kombination tragen, wobei Stx2-exprimierende Stämme schwerwiegendere Erkrankungen auslösen (Boerlin *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2002).

Shiga Toxine sind Holotoxine, die aus einer A-Untereinheit (32 kDa) und fünf identischen B-Untereinheiten (je 7,7 kDa) aufgebaut sind. Die A-Untereinheit setzt sich wiederum aus den Komponenten A₁ (27 kDa) und A₂ (4 kDa) zusammen. Während die A₁-Untereinheit das aktive Zentrum darstellt, vermittelt die A₂-Untereinheit die C-terminale, nicht-kovalente Bindung an die B-Untereinheiten. Die B-Untereinheiten bilden ein Pentamer und sind für die Bindung an Glykolipidrezeptoren auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen verantwortlich. Unter diesen Rezeptoren gilt Globotriaosylceramid (Gb3) als die Hauptzielstruktur von Stx. Die Variante Stx2e bindet an den Rezeptor Globotetraosylceramid (Gb4). Weiterhin ist auch eine Bindung von Stx an das Blutgruppen-Glykolipidantigen P₁ möglich. Im Anschluss an die Bindung und die Rezeptor-vermittelte Endozytose kann entweder ein Abbau von Stx nach Fusion mit Lysosomen oder ein retrograder Transport des Toxins zu dem endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgen. Während des Transportes wird die A-Untereinheit im Trans-Golgi Netzwerk proteolytisch gespalten, wobei die Fragmente A₁ und A₂ über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Diese wird im ER reduziert und nach dem Transport in das Zytosol interagiert die A₁-Untereinheit mit der 60S-Untereinheit der Ribosomen. Aufgrund ihrer rRNA-N-Glykosidase-Aktivität spaltet sie ein Adenin

aus dem 28S rRNA-Fragment der eukaryotischen, ribosomalen 60S-Untereinheit. Im Zuge der Depurinierung wird die Bindung der Elongationsfaktor 1-abhängigen Aminoacyl-tRNA unterbunden, wodurch die Elongation der Peptidkette nicht mehr möglich ist (O'Loughlin und Robins-Browne, 2001; Cherla *et al.*, 2003). Diese irreversible Hemmung der Proteinbiosynthese führt zum Tod der eukaryontischen Zelle. Darüber hinaus können Shiga Toxine die Apoptose bei, zumindest einigen, eukaryotischen Zelltypen auslösen (Cherla *et al.*, 2003). Nach dem Transport in intakter Form durch die Darmmukosa, bindet Stx im Blutkreislauf an polymorphkernige Leukozyten (Te Loo *et al.*, 2001), mit deren Hilfe es zu verschiedenen Organen transportiert wird. Unter diesen Organen exprimieren die humanen Nieren große Mengen an Gb3 und stellen somit einen Hauptangriffsort von Stx dar. Neben der Bindung an Epithel- und Endothelzellen stellen auch Monozyten und Makrophagen eine Zielstruktur dar. Diese werden durch Stx zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine, vornehmlich des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) und des Interleukins-1 β (IL-1 β), angeregt. Insbesondere TNF- α stimuliert die Expression von Gb3, wodurch die Bindungskapazität für Stx an den Zielzellen erhöht wird (O'Loughlin und Robins-Browne, 2001).

Die Stx-kodierenden Gene sind im Genom temperenter, lambdoider Bakteriophagen lokalisiert. Diese doppelsträngigen DNA-Phagen aus den Familien der *Siphoviridae* und *Myoviridae* bestehen aus einem rundlichen oder länglichen, hexagonalen Kopf und einem kontraktilen oder nicht-kontraktilen, flexiblen Schwanz mit einer Länge von 27 bis 177 nm (Schmidt, 2001). Die Genome bereits beschriebener, intakter Stx-konvertierender Bakteriophagen mit einer Größe von etwa 42,6 bis 62,7 kb zeigen einen heterogenen Aufbau hinsichtlich ihrer Genzusammensetzung. Wie der Phage Lambda (λ) besitzen sie die Abfolge, sowie alle notwendigen Gene, der Regionen für die Rekombination, frühe Regulation, Immunität, DNA-Replikation, späte Regulation, Lyse und Morphogenese. Dagegen ist die Ausstattung anderer Sequenzbereiche sehr unterschiedlich. Häufig tragen sie infolge von Rekombinationserereignissen neben IS-Elementen auch Bakteriengene oder Gene anderer Phagen (Herold *et al.*, 2004). Bei diesen Genen handelt es sich um eigenständige genetische Einheiten, sogenannte Morons, die neben dem entsprechenden Gen aus dem stromaufwärts gelegenen Promotor und dem stromabwärts folgenden Terminator bestehen. Aus diesem Grund können sie unabhängig von der Phagen-DNA transkribiert werden (Hendrix *et al.*, 2000). Von Hendrix *et al.* (2000) wurde auch *stx* zu diesen Morons

gezählt. Die entsprechenden Gene für die A- und B-Untereinheiten befinden sich in der Region der späten Regulation zwischen den Phagen-Genen des Antiterminators *Q* und des Holins *S* der Lysekassette, wenngleich dieser Sequenzabschnitt in seiner Zusammensetzung bei verschiedenen Phagen sehr heterogen sein kann (Unkmeir und Schmidt, 2000). Weiterhin besitzen die in einem Operon organisierten *stx*-Gene einen eigenen Promotor und Terminator, die allerdings für die Transkription allein nicht ausschlaggebend sind (Sung *et al.*, 1990; Wagner und Waldor, 2002). Der durch Eisen regulierte Promotor p_{Stx1} des Stx1-konvertierenden Bakteriophagen H-19B trägt nur im Zusammenspiel mit den zwei Phagen-Promotoren p_R und $p_{R'}$ zur Transkription von *stx*₁ bei (Calderwood und Mekalanos, 1987; Wagner und Waldor, 2002). Dagegen scheint der Eisen-unabhängig regulierte Promotor p_{Stx2} keine oder nur eine untergeordnete Rolle bei der Transkription von *stx*₂ zu spielen. Für diese ist in erster Linie der späte Phagen-Promotor $p_{R'}$ verantwortlich (Wagner *et al.*, 2001b; Wagner und Waldor, 2002).

Normalerweise liegt die DNA Stx-konvertierender Phagen nach der Injektion in eine Wirtszelle integriert im Genom dieser lysogenen Bakterien vor. In diesem nicht-infektiösen Zustand wird der Prophage mit dem Bakterienchromosom bei der Zellteilung repliziert und an die Tochterzellen weitergegeben. Spontan oder durch negative Umwelteinflüsse kann der lysogene in den lytischen Lebenszyklus des Phagen übergehen. Zu diesen Einflüssen zählen bei Stx-Phagen insbesondere Antibiotika wie Mitomycin C, Norfloxacin, Ciprofloxacin, Trimethoprim (Yee *et al.*, 1993; Grif *et al.*, 1998; Matsushiro *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2000), sowie Olaquinox und Carbadox, die bis 1999 in der Tiermast als Leistungsförderer eingesetzt wurden (Köhler *et al.*, 2000). Weiterhin konnte eine Phageninduktion in Gegenwart von UV-Strahlung, Norepinephrin, H₂O₂ oder neutrophilen Granulozyten beobachtet werden (Lyte *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 2001a). Im Zuge der durch diese Substanzen ausgelösten bakteriellen SOS-Antwort wird das RecA-Protein aktiviert, das unter anderem das Phagen-Repressorprotein CI spaltet (Fuchs *et al.*, 1999). CI blockiert durch seine Bindung an die Operatoren o_L und o_R die Transkription der Antiterminationsgene *N* und *Q* und somit die Bildung von Phagenpartikeln. Die Spaltung von CI führt zur Expression des Proteins N, das den Promotor p_R aktiviert. Dies führt zur Produktion des Proteins Q, das wiederum an den Promotor $p_{R'}$ bindet und so neben der Transkription von Genen der Lysekassette und zur Morphogenese auch die Expression von Stx induziert wird (Wagner und Waldor, 2002; Waldor und Friedman, 2005).

Nach der Zusammensetzung der so entstandenen Phagenpartikel werden diese durch enzymatische Lyse der Wirtszelle freigesetzt. Sie können an neue Bakterienzellen adsorbieren und diese infizieren, wobei ein bereits durch den selben Phagen infiziertes, lysogenes Bakterium gegenüber diesem Vorgang immun ist. Die Integration der Stx-Phagen-DNA in das Bakteriengenom erfolgt in der Regel über eine ortspezifische Rekombination zwischen den sogenannten „Attachment Sites“ des Phagen (*attP*) und des Bakteriums (*attB*). Aus diesem Grund wird ein integriertes Prophagenom von zwei Kopien eines Motivs, das sich durch eine direkte Sequenzwiederholung auszeichnet, flankiert (*attL* und *attR*). Mit Hilfe der vollständigen Kopien dieses Motivs kann die genaue Insertionsstelle eines Prophagen bestimmt werden. Integrationsstellen Stx-konvertierender Phagen befinden sich häufig innerhalb oder in unmittelbarer Nachbarschaft von tRNA-Genen oder chromosomalen Genen, die Proteine des Primärstoffwechsels kodieren. Verschiedene Integrationsstellen, wie *wrbA*, *sbcB*, *yehV/mlrA* oder *yecE* wurden bisher beschrieben (Herold *et al.*, 2004). So kodiert *wrbA* das Tryptophanrepressor-Bindeprotein WrbA (Plunkett, III *et al.*, 1999), *sbcB* für eine 3′-5′ Exonuklease (Seigneur *et al.*, 1999) und *yehV/mlrA* das Regulatorprotein MlrA (Brown *et al.*, 2001).

Neben intakten Phagen, die in der Lage sind das Wirtsgenom infolge des lytischen Zyklus wieder zu verlassen, tragen Bakterien kryptische Prophagen in ihrem Chromosom. Diesen fehlen aufgrund von Rearrangements innerhalb des Phagengenoms wichtige, funktionelle Gene zur Bildung intakter Phagenpartikel. Daher sind sie nicht mehr in der Lage ihr Wirtsgenom zu verlassen und neue Zellen zu infizieren. Die Integration von Phagen-DNA kann unterschiedliche Auswirkungen auf das lysogene Bakterium haben. Zum einen kann ein bakterielles Gen durch die Integration zerstört werden, so dass kein funktionelles Protein mehr gebildet werden kann. Zum anderen kann die Fitness des Wirtsbakteriums infolge von Phagen-assoziierten Morons erhöht werden. Der bereits sequenzierte *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 trägt im Vergleich zur Genomsequenz des apathogenen *E. coli* K-12 Stammes MG1655 18 Prophagen, wobei nur der Stx2-konvertierende Bakteriophage 933W intakt ist. Zu den 17 kryptischen Prophagen zählt auch der Stx1-Phage CP-933V (Perna *et al.*, 2001). Somit stellen Bakteriophagen mobile genetische Elemente dar, die unter anderem Virulenzgene mittels horizontalem Gentransfer verbreiten und zur Entstehung neuer Krankheitserreger beitragen können, was durch Transduktionsexperimente belegt wurde (Cornick *et al.*, 2006).

1.3.2. „Cytolethal Distending Toxin V“

Das „Cytolethal Distending Toxin“ V (CDT-V) stellt einen weiteren potentiellen Virulenzfaktor der STEC dar, der vor allem bei Sorbitol-fermentierenden STEC O157:H⁻ Stämmen, sowie häufig bei STEC der Serotypen O91:H21 und O113:H21 vorkommt (Janka *et al.*, 2003; Bielaszewska *et al.*, 2004). Sein Gen wird von Sequenzen eines P2-Phagen flankiert (Janka *et al.*, 2003) und es besteht wie andere Holotoxine dieser Gruppe aus den drei Proteinen CdtA, CdtB, CdtC. CdtA und CdtC stellen wahrscheinlich die heterodimere B-Untereinheit dar, die für die Bindung an die entsprechenden Zielzellen und den intrazellulären Transport des Toxins notwendig ist. CdtB beinhaltet die enzymatisch aktive A-Untereinheit. Diese wird direkt in den Zellkern transportiert, wo sie mittels ihrer DNase I ähnlichen Aktivität die DNA der Wirtszelle schädigt. Aufgrund der DNA-Schädigung wird die Mitose am Übergang der G₂- zur M-Phase gestoppt. Dieser irreversible Zustand führt zur Filamentierung der Bakterienzelle, zur Hemmung der Zellteilung und letztendlich zum Tod der eukaryotischen Zelle (Ceelen *et al.*, 2006). Zum einen kann CDT-V zur Pathogenese von EHEC beitragen, da es *in vitro* humane Endothelzellen schädigt (Bielaszewska *et al.*, 2005). Zum anderen könnte es in Lymphozyten Apoptose auslösen und so eine lokale Immunsuppression verursachen (Ceelen *et al.*, 2006).

1.3.3. Plasmidkodierte Pathogenitätsfaktoren

Neben Shiga Toxinen tragen STEC weitere Virulenzfaktoren auf Plasmiden. Verschiedene Virulenzplasmide wurden bisher beschrieben. Sie zeichnen sich durch unterschiedliche Größen und Replikons aus, kodieren allerdings häufig für ähnliche Virulenzeigenschaften. Das bereits sequenzierte Plasmid pO157 des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 besitzt eine Größe von 92 kb (Burland *et al.*, 1998). pO157-ähnliche Plasmide mit einer Größe von 80 bis 105 kb sind innerhalb verschiedener STEC-Serogruppen weit verbreitet. Dies gilt auch für die 110 bis 150 kb großen pO113-ähnlichen Plasmide. Klinische Isolate tragen weiterhin pO103-ähnliche Plasmide mit einer Größe von 70 bis 95 kb (Prager *et al.*, 2005). Darüber hinaus wurde vor kurzem das Plasmid pSFO157 eines *E. coli* O157:H⁻ Stammes beschrieben (Brunner *et al.*, 2006).

1.3.3.1. Enterohämolysin

Das plasmidkodierte Enterohämolysin, auch als EHEC-Hämolysin bezeichnet, gehört zur RTX (repeats in toxin)-Familie porenbildender Zytolysine (Schmidt *et al.*, 1994a; Schmidt *et al.*, 1996b). Auf Blutagarplatten mit gewaschenen Erythrozyten verursacht es eine spezielle Form der Hämolyse. Bei diesem enterohämolytischen Phänotyp bilden sich kleine trübe Höfe um die betreffenden EHEC-Kolonien. Die Enterohämolysin-kodierenden Gene sind in einem Operon mit der Abfolge *hlyC*, *hlyA*, *hlyB*, *hlyD* angeordnet, das ca. 60% Übereinstimmung zu dem des *E. coli* α -Hämolysins aufweist (Schmidt *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1996a). Das inaktive Vorläuferprotein des Enterohämolysins HlyA wird von HlyC in die aktive Form umgewandelt. Die Sekretion des aktiven HlyA erfolgt unter anderem mit Hilfe eines spezifischen, von den Genen *hlyB* und *hlyD* kodierten Typ I Sekretionssystems.

Das Enterohämolysin-Gen *hlyA* ist innerhalb verschiedener STEC-Serogruppen sehr weit verbreitet (Prager *et al.*, 2005). Zum einen lysiert Enterohämolysin Erythrozyten, wodurch freies Häm und Hämoglobin zur Verfügung stehen. Diese Erythrozytenbestandteile dienen als Eisenquelle und verbessern die Wachstumsbedingungen der EHEC (Law und Kelly, 1995). Zum anderen wurde gezeigt, dass Enterohämolysin die Produktion von IL-1 β humaner Monozyten steigert (Taneike *et al.*, 2002). Allerdings ist die genaue Rolle des Enterohämolysins in der Pathogenese von EHEC bisher ungeklärt.

1.3.3.2. Serinprotease

Die extrazelluläre Serinprotease EspP, ein plasmidkodiertes Protein aus der Familie der Autotransporter, gilt als ein weiterer Virulenzfaktor der EHEC. EspP wird als großes Vorläuferprotein synthetisiert, das während der Sekretion am N- und C-Terminus prozessiert wird. Der N-Terminus beinhaltet die enzymatische Aktivität von EspP, während der C-Terminus für den Transport durch die äußere Membran des Bakteriums verantwortlich ist. Die Fähigkeit von EspP neben Pepsin den humanen Gerinnungsfaktor V zu spalten, könnte *in vivo* zu einer verzögerten Blutgerinnung führen und somit zur Ausbildung von Symptomen einer HC beitragen (Brunner *et al.*, 1997). Die genaue Funktion von EspP im Verlauf einer EHEC-Infektion ist bisher unbekannt.

1.3.3.3. Katalase-Peroxidase

Die plasmidkodierte, bifunktionelle Katalase-Peroxidase KatP ist im periplasmatischen Raum von EHEC lokalisiert (Brunner *et al.*, 1996). Aufgrund ihrer Eigenschaft als Peroxidase kann sie unter anderem Wasserstoffperoxid zu Wasser reduzieren und als Katalase aus Wasserstoffperoxid mittels einer Disproportionierung Wasser und Sauerstoff erzeugen. Somit könnte sie das Bakterium gegenüber toxischen Oxidantien schützen, die während der Immunantwort gebildet werden.

1.3.3.4. Metalloprotease

Die neutrale Zink-Metalloprotease StcE, sowie das für ihre Sekretion verantwortliche Etp-Typ II Sekretionssystem sind auf dem gleichen Plasmid kodiert (Schmidt *et al.*, 1997). StcE spaltet den C1 Esterase Inhibitor, ein Mitglied der Serinprotease-Inhibitor-Familie und wichtiger Regulator der klassischen Komplementkaskade (Lathem *et al.*, 2002). Allerdings wird der C1 Esterase Inhibitor durch diese Spaltung nicht inaktiviert, sondern seine Aktivität zur Runterregulierung der klassischen Komplementaktivierung erhöht. Dadurch könnte das Bakterium während einer EHEC-Infektion vor der Zerstörung durch das Komplementsystem geschützt werden (Lathem *et al.*, 2004). Weiterhin könnte StcE zur Anheftung von EHEC an das Darmepithel beitragen, indem sie schützende Glykoproteine von der Zelloberfläche abspaltet. Außerdem spaltet StcE Glykoproteine des Speichels und verhindert so die Aggregation und Eliminierung der Bakterien in der Mundhöhle. Dies könnte zu der geringen Infektionsdosis von EHEC beitragen (Grys *et al.*, 2005).

1.3.3.5. Subtilase Zytotoxin

Auf dem Plasmid pO113 des STEC O113:H21 Stammes wurde das Gen eines weiteren AB₅-Toxins identifiziert. Dieses Toxin ist wie Stx aus einer A-Untereinheit und fünf B-Untereinheiten aufgebaut. Aufgrund der Subtilase-artigen Serinprotease-Aktivität der A-Untereinheit wird es als Subtilase Zytotoxin SubAB bezeichnet (Paton *et al.*, 2004). SubAB wirkt stark zytotoxisch auf eukaryotische Zellen, indem es das essentielle ER-Chaperon BiP (bzw. GRP78), ein Hauptregulator des endoplasmatischen Retikulums (ER), spaltet. Dadurch wird die BiP-vermittelte korrekte Faltung von Proteinen im ER, der Abbau fehlerhafter Proteine, die selektive Aufnahme von

Proteinen an der Membran des ER und ein Entgegenwirken der Apoptose verhindert, was letztendlich zum Tod der eukaryotischen Zelle führt (Paton *et al.*, 2006).

1.3.4. Chromosomale Pathogenitätsinseln

Verschiedene Virulenzfaktoren sind chromosomal in sogenannten Pathogenitätsinseln kodiert. Die bei pathogenen Bakterien vorkommenden Inseln weisen eine Größe bis 200 kb auf und tragen ein oder mehrere Virulenzgene, sowie mobile genetische Elemente, wie IS-Elemente oder Transposasen. Daher besitzen sie eine mosaikartige Struktur und eine gewisse genetische Instabilität. Außerdem unterscheiden sich diese, häufig in unmittelbarer Nachbarschaft von tRNA-Genen lokalisierten, Pathogenitätsinseln in ihrem G+C-Gehalt vom Kerngenom eines Bakteriums (Hacker *et al.*, 1997; Schmidt und Hensel 2004).

Neben der bekanntesten Pathogenitätsinsel, dem „Locus of Enterocyte Effacement“ (LEE) können STEC ebenfalls eine „Tellurite Resistance and Adherence-Conferring“ Insel (TAI) tragen. Innerhalb der TAI ist neben den vier Tellurit-Resistenzgenen *tlpA* bis *tlpD* das äußere Membranprotein kodierende, Eisen-abhängig regulierte Gen *iha* lokalisiert (Tarr *et al.*, 2000; Rashid *et al.*, 2006). *Iha* zeigt keine Sequenzähnlichkeit zu anderen Adhäsinen auf Aminosäureebene, vermittelt allerdings die Adhärenz an HeLa-Zellen (Tarr *et al.*, 2000). Ein vermutlich nicht funktionelles Typ III Sekretionssystem kodiert ETT2 („E. coli Type Three Secretion 2“), eine genomische Insel, die Ähnlichkeiten zu verschiedenen Genen der SPI-1, SPI-2 und SPI-3 Pathogenitätsinseln von *Salmonella* spp. aufweist (Hayashi *et al.*, 2001; Ren *et al.*, 2004). Weitere potentielle Pathogenitätsinseln stellen der „Locus of Proteolysis Activity“ (LPA) und die „High-Pathogenicity“ Insel (HPI) dar. In der Region des LPA wird eine Protease kodiert, die an der Invasion und der Zerstörung des intestinalen Epithels beteiligt sein könnte (Schmidt *et al.*, 2001). Die HPI dagegen trägt ein Eisenaufnahmesystem (Karch *et al.*, 1999). Während die TAI und ETT2 sowohl bei Stämmen der Serogruppe O157 als auch nicht-O157 STEC Stämmen vorkommen, sind die HPI und der LPA bisher nur bei nicht-O157 Isolaten nachgewiesen worden (Karch *et al.*, 1999; Tarr *et al.*, 2000; Hartleib *et al.*, 2003).

Darüber hinaus kann im Genom der STEC die genetische Information zur Ausbildung weiterer Adhäsine vorliegen. Zu diesen zählen, neben LEE-kodierten Proteinen und *Iha*, der ebenfalls chromosomal kodierte „EHEC Factor for Adherence“ Efa1 (Nicholls

et al., 2000) und die langen polaren Fimbrien LPF (Torres *et al.*, 2002), sowie das plasmidkodierte „STEC Autoagglutination Adhesin“ Saa (Paton *et al.*, 2001), das Adhärenz-vermittelnde „Clostridium difficile-like“ Toxin ToxB (Tatsuno *et al.*, 2001) und die auf dem Plasmid pSFO157 lokalisierten Fimbrien Sfp (Brunder *et al.*, 2001).

1.3.4.1. „Locus of Enterocyte Effacement“

1.3.4.1.1. genetische Organisation

Die komplette 35,624 kb umfassende Sequenz des „Locus of Enterocyte Effacement“ wurde erstmals 1998 für den enteropathogenen *E. coli* (EPEC) Stamm E2348/69 beschrieben (Elliott *et al.*, 1998). In verschiedenen STEC-Stämmen trägt die betreffende Pathogenitätsinsel neben dieser Kernregion des LEE weitere Gene. So beinhaltet die entsprechende Pathogenitätsinsel OI#148 des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 zusätzlich 7,5 kb eines kryptischen Prophagen (Perna *et al.*, 1998) oder die 111 kb große Pathogenitätsinsel I des *E. coli* O103:H2 Stammes RW1374 weitere Virulenzfaktoren (Jores *et al.*, 2005). Es sind verschiedene Integrationsorte des LEE im Genom von STEC bekannt. Neben dem erstbeschriebenen tRNA-Gen *selC* (McDaniel *et al.*, 1995) wurden die sequenzidentischen tRNA-Gene *pheU* und *pheV* als Integrationsstellen identifiziert (Sperandio *et al.*, 1998; Jores *et al.*, 2001).

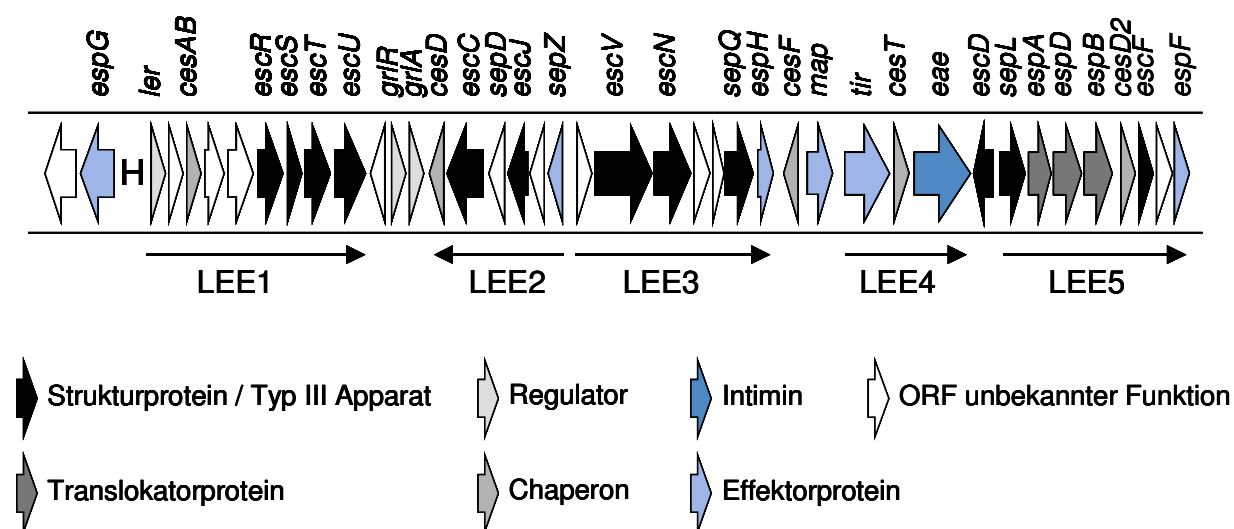


Abbildung 1: Schematische Darstellung der genetischen Organisation des „Locus of Enterocyte Effacement“ (nach Garmendia *et al.*, 2005a). Erläuterungen im Text. H steht für eine enterobakterielle repetitive intergenische Konsensussequenz (ERIC).

Die 41 offenen Leserahmen des LEE sind in den fünf polycistronischen Operons LEE1 bis LEE5 angeordnet (Elliott *et al.*, 1998) (Abb. 1). Dabei kodieren LEE1, LEE2 und LEE3 überwiegend die Strukturproteine Esc („*E. coli* secretion“) eines funktionellen Typ III Sekretionssystems (T3SS), während LEE4 vor allem die Gene der Translokatorproteine Esp („*E. coli* secreted proteins“) des T3SS beinhaltet. LEE5 enthält die Gene *tir* und *eae*, deren Produkte für eine enge Anheftung des Bakteriums an eukaryotische Wirtszellen verantwortlich sind. Gene für weitere fünf Effektorproteine sind an unterschiedlichen Stellen des gesamten LEE lokalisiert. Darüber hinaus trägt der LEE *ces*-Gene („chaperone for *E. coli* secreted protein“) für bisher fünf charakterisierte Chaperone. Die Chaperone sind für die effiziente Sekretion und Translokation verschiedener sekretierter Proteine verantwortlich. Ebenfalls in der Region des LEE sind drei Regulatoren und die Proteine Sep („secretion of *E. coli* proteins“), die eine Rolle für die Proteinsekretion spielen, kodiert (Elliott *et al.*, 1998; Garmendia *et al.*, 2005a). Außerdem haben bisherige Untersuchungen bei *E. coli* gezeigt, dass die T3SS-Apparat kodierenden Gene hochkonserviert sind, im Gegensatz zu den Genen der Translokator- und Effektorproteine (Frankel *et al.*, 1998).

1.3.4.1.2. Regulation

Die Regulation des LEE ist sehr komplex und derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Sie erfolgt durch verschiedene Umwelteinflüsse, wie Temperatur, Osmolarität, pH-Wert, Wachstumsphase, die Verfügbarkeit von Kalzium, Natriumhydrogencarbonat, Eisen, Norepinephrin oder Epinephrin, sowie Quorum sensing, eine Art der Zell-Zell-Kommunikation in Konzentrationsabhängigkeit sekretierter Signalmoleküle, sogenannter Autoinduktoren (Rosenshine *et al.*, 1996; Kenny *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 2002; Kaper und Sperandio, 2005; Walters und Sperandio, 2006). Diese Umwelteinflüsse wirken auf eine Reihe von Regulatoren ein, die zum größten Teil außerhalb des LEE kodiert werden. Als LEE-aktivierende Regulatoren sind bisher der globale Regulator IHF („Integration Host Factor“) (Friedberg *et al.*, 1999), die Ribosomen-bindende GTPase BipA (Grant *et al.*, 2003), der „Factor for Inversion Stimulation“ Fis (Goldberg *et al.*, 2001), die „Quorum-Sensing *E. coli*“ Regulatoren QseA und QseD (Sperandio *et al.*, 2002; Kaper und Sperandio, 2005), die Protease ClpXP (Iyoda und Watanabe, 2005), die nicht-kodierende RNA DsrA (Laaberki *et al.*, 2006), der Sigma-Faktor RpoS (Iyoda und Watanabe, 2005; Laaberki *et al.*, 2006)

und das Signalmolekül ppGpp (Nakanishi *et al.*, 2006) bekannt. In EPEC sind weiterhin der „Plasmid-encoded Regulator“ PerC und indirekt PerA (Mellies *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2004) zur Aktivierung des LEE notwendig, während in EHEC die chromosomal kodierten PerC-homologen Proteine PchA, PchB und PchC diese Funktion ausüben (Iyoda und Watanabe, 2004). Reprimierend auf die Genexpression des LEE wirken dagegen das Histon-artige Protein H-NS (Bustamante *et al.*, 2001), das Protein Hha (Sharma und Zuerner, 2004), die Proteine YhiE und YhiF (Tatsuno *et al.*, 2003) oder auch die Proteine EtrA und EivF, deren Gene in der Pathogenitätsinsel ETT2 lokalisiert sind (Zhang *et al.*, 2004). Die meisten dieser Proteine beeinflussen direkt die Transkription des „LEE-encoded Regulators“ Ler, dessen kodierendes Gen sich an erster Position des Operons LEE1 befindet. Ler ist der essentielle, zentrale Regulator für die Expression der Gene des LEE (Friedberg *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 2000). Durch die Bindung des Antirepressors Ler in den Promotorregionen der Operons LEE2 bis LEE5 wird die Anlagerung des reprimierenden H-NS-Nukleoproteinkomplexes an einer anderen Stelle der Promotoren unterbunden und die Transkription weiterer Gene ermöglicht (Bustamante *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist Ler ein negativer Autoregulator des Operons LEE1. Durch die Bindung von Ler in der Promotorregion von LEE1 wird seine Expression auf ein relativ geringes Niveau gedrosselt. Diese Regulation ermöglicht weiterhin eine Aktivierung weiterer LEE-Promotoren und verhindert die Überexpression von Ler, so dass eine effiziente Kolonisierung des Wirtes ermöglicht wird (Berdichevsky *et al.*, 2005). Ebenfalls direkt auf die Expression von Ler wirken der Globale Regulator des LEE-Aktivator GrlA und der Globale Regulator des LEE-Repressor GrlR, deren Gene in der Region zwischen LEE1 und LEE2 lokalisiert sind (Deng *et al.*, 2004). Dabei beeinflusst GrlA die Transkription von *ler* positiv (Barba *et al.*, 2005) und GrlR dagegen negativ (Lio und Syu, 2004). Allerdings scheint GrlR durch die Repression von GrlA indirekt auf die Expression von Ler einzuwirken (Iyoda und Watanabe, 2005).

1.3.5. Aufbau und Funktion des Typ III Sekretionssystems

Der LEE kodiert ein funktionelles Typ III Sekretionssystem. Dieses T3SS ermöglicht die Adhärenz der Bakterien an die Darmmukosa unter Ausbildung sogenannter „At-taching and Effacing“ (A/E)-Läsionen. Charakteristisch für A/E-Läsionen ist die lokale

Zerstörung des Bürstensaums der Enterozyten und die Umorganisation des Zytoskeletts der eukaryotischen Wirtszelle, wodurch sockelartige Ausstülpungen gebildet werden, auf denen die Bakterien fest angeheftet sind (Knutton *et al.*, 1987; Frankel *et al.*, 1998). Die initiale Anlagerung an die Darmmukosa erfolgt vermutlich durch verschiedene Adhäsine, die außerhalb des LEE kodiert werden. Die Schädigung des Bürstensaums und die Anlagerung des Bakteriums werden dagegen durch die Expression des LEE verursacht (Nataro und Kaper, 1998).

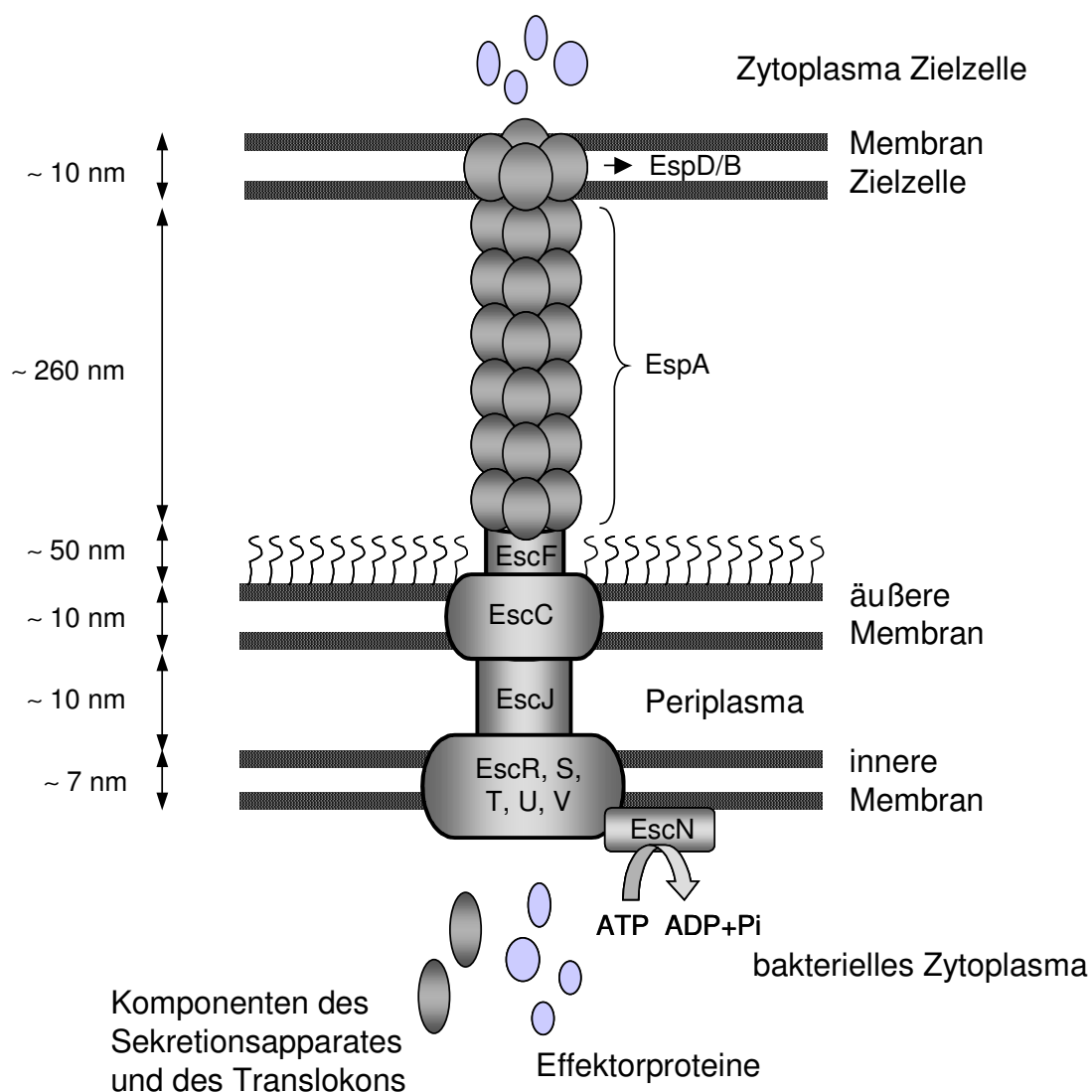


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Typ III Sekretionssystems (nach Garmendia *et al.*, 2005a). Erläuterungen im Text.

Der nadelähnliche Typ III Sekretionsapparat durchspannt die innere und äußere bakterielle Zellmembran und setzt sich aus etwa 20 verschiedenen Genprodukten zusammen (Abb. 2). Für einige dieser Proteine wird die Funktion und Lokalisation innerhalb des Sekretionsapparates nur aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu Proteinen mit bekannter Funktion von T3SS anderer Bakterien wie *Salmonella* oder *Shigella* angenommen (Elliott *et al.*, 1998). Den Basalkörper des Typ III Sekretionsapparates, der die innere Membran des Bakteriums durchspannt, bilden die Proteine EscR, EscS, EscT, EscU und EscV. In der äußeren Membran ist das Protein EscC lokalisiert. Verbunden werden diese beiden Proteinkomplexe durch EscJ, das eine zylinderartige Struktur ausbildet und so das gesamte Periplasma durchspannt. Die eigentliche Nadel wird von dem Protein EscF gebildet (Abb. 2). Neuere Ergebnisse deuten darüber hinaus auf eine Stabilisierung der Nadelstruktur durch EscD hin. Wobei dieses Protein sowohl mit EscC als auch mit EscF interagiert (Ogino *et al.*, 2006). Nach der Aktivierung des T3SS werden zunächst verschiedene Translokatorproteine sekretiert. Dabei bindet EspA zuerst an EscF und polymerisiert dann mit weiteren EspA-Untereinheiten zu einem filamentösen Hohlkörper. Durch diese Nadelstruktur wird der direkte Transport von bakteriellen Proteinen zu eukaryotischen Wirtszellen ermöglicht. In der Zytoplasmamembran der Zielzelle formen die Translokatorproteine EspB und EspD eine Pore (Abb. 2). Dadurch wird die filamentöse Nadelstruktur in der Wirtszelle verankert und die Sekretion von Proteinen in die Zelle möglich (Clarke *et al.*, 2003; Garmendia *et al.*, 2005a).

Der Transport der membrangebundenen Komponenten des Basalkörpers des T3SS ist dabei vom Sec-System abhängig. Dagegen erfolgt der Aufbau des filamentösen Teiles des T3SS unabhängig vom Sec-System. Die notwendige Energie für die Proteinsekretion wird dann von der zytoplasmatischen ATPase EscN geliefert (Garmendia *et al.*, 2005a). Weiterhin erfolgt die Proteinsekretion in einer zeitlichen Abfolge. So werden erst die Translokatorproteine durch den Typ III Sekretionsapparat transportiert und, unter anderem durch eine Verringerung der Kalziumkonzentration in der Umgebung, im Anschluss die Effektorproteine. Wie diese Umstellung der Sekretion erfolgt ist bisher nur unzureichend aufgeklärt. Allerdings scheint sie unter der Kontrolle der Proteine SepL und SepD stattzufinden (Deng *et al.*, 2005; Garmendia *et al.*, 2005a).

Eine ebenfalls wichtige Funktion üben die Chaperone des LEE aus. So sind die Chaperone CesD und CesD2 für den Transport der Translokatoren EspD und EspB

bzw. nur EspD im Zytoplasma und durch die innere Membran notwendig. CesAB ist neben dieser Funktion für EspB auch essentiell für die Stabilisierung von EspA im Zytoplasma und die Ausbildung des EspA-Filamentes. Im Gegensatz dazu spielen die Chaperone CesF und CesT für die Translokation der Effektorproteine EspF bzw. Tir und Map eine entscheidende Rolle (Clarke *et al.*, 2003; Garmendia *et al.*, 2005a). In der Region des Operons LEE4 kodiert *eae* das Protein Intimin. Das Gen *eae* weist vor allem in der 3'-Region Sequenzunterschiede auf. Dies führte zur Definition verschiedener *eae*-Subtypen, die mit griechischen Buchstaben bezeichnet sind, und die vermutlich für unterschiedliche Kolonisationsorte im Darm verantwortlich sind (Fitzhenry *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002b; Blanco *et al.*, 2004). Intimin wird nach dem Transport in das Periplasma in die äußere Membran des Bakteriums eingebaut und bindet an den Rezeptor Tir („Transmembrane Intimin Receptor“), der in der eukaryotischen Zytoplasmamembran lokalisiert ist. Das Effektorprotein Tir wird mit Hilfe des T3SS in die Wirtszelle transportiert und anschließend in die Zellmembran eingebaut, wo es als Rezeptor fungiert. Durch die Bindung von Intimin kommt es zu einer irreversiblen, engen Adhärenz des Bakteriums an die Wirtszelle. Weiterhin verändert Tir den Metabolismus der Wirtszelle und löst so eine Umorganisation des Zytoskeletts aus. Dies führt zur Ausbildung der Aktin-reichen sockelartigen Strukturen unterhalb des Bakteriums (Dean *et al.*, 2005; Garmendia *et al.*, 2005a). Nach der Sekretion von Effektorproteinen werden die EspA-Filamente und Teile des T3SS an der Oberfläche des Bakteriums abgebaut, um die Intimin-Tir-vermittelte Anlagerung zu gewährleisten. Dem Translokatorprotein EspB wird ebenfalls eine Funktion bei der Veränderung des Zytoskeletts der Wirtszelle zugeschrieben. Weitere Effektorproteine sind das „Mitochondrion-associated Protein“ Map, EspF, EspG, EspH und SepZ, die allerdings, im Gegensatz zu Tir, für die T3SS-vermittelte Virulenz nicht essentiell sind. Map schädigt zum einen die Mitochondrien, zum anderen ist es für die transiente Ausbildung Filopodium-artiger Strukturen und die Schädigung der Darmwand verantwortlich. EspF sorgt für eine höhere Permeabilität der Darmmukosa und kann darüber hinaus bei Mitochondrien Apoptose auslösen. Dagegen sind EspG und EspH an der Umordnung des Wirtszytoskeletts beteiligt. Die Funktion von SepZ ist derzeit noch unbekannt (Dean *et al.*, 2005; Garmendia *et al.*, 2005a).

1.3.6. Außerhalb des LEE kodierte Effektorproteine

In den letzten Jahren wurden weitere Effektorproteine des T3SS identifiziert, die außerhalb der Pathogenitätsinsel des LEE kodiert werden. So untersuchten Deng *et al.* (2004) den LEE von *Citrobacter rodentium*, eines Maus-pathogenen Bakteriums, das ebenfalls A/E-Läsionen verursacht und Ähnlichkeiten zu STEC und EPEC aufweist. Im Zuge einer Proteom-Analyse wurden sieben Effektorproteine im Genom von *C. rodentium* identifiziert und als „Non-LEE-encoded Effektoren“ NleA bis NleG bezeichnet. Mit Ausnahme von NleG konnten den kodierenden Genen homologe Sequenzen im Genom des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933, sowie weiteren Bakterien wie *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas syringae* oder *Yersinia pestis* zugeordnet werden (Deng *et al.*, 2004). Ein Datenbankabgleich der Sequenz des *E. coli* O157:H7 Stammes RIMD 0509952 wies auf über 60 potentielle Effektor-kodierende Gene hin, von denen 49 als funktionell angesehen wurden. Experimentell konnten davon 39 Proteine als T3SS Effektoren bestätigt werden (Tobe *et al.*, 2006). Einige dieser Proteine weisen auch Ähnlichkeiten zu Effektoren von *S. flexneri* oder dem Pflanzen-pathogenen Bakterium *P. syringae* auf. Aufgrund von Sequenzunterschieden auf Aminosäureebene wurden die Effektorproteine in über 20 Familien eingeteilt, deren Vertreter zum Teil mehrmals im Genom des Stammes RIMD 0509952 vorkommen. Mit 14 Genen tritt dabei die Familie NleG in diesem Stamm am häufigsten auf. Weiterhin ist die Mehrzahl der potentiellen Effektorproteine im Genom neun verschiedener lambdoider Bakteriophagen kodiert. Die entsprechenden Gene sind direkt stromabwärts der Morphogenese-Region lokalisiert und jedes Phagengenom enthält mehrere Effektorprotein-kodierende Gene (Tobe *et al.*, 2006). Obwohl bisher etwa 20 verschiedene in STEC und EPEC vorkommende nicht-LEE kodierte Effektorproteine identifiziert wurden, sind bisher nur wenige von ihnen näher charakterisiert worden. Für die meisten Proteine ist bisher nur die Translokation in eukaryotische Wirtszellen durch das LEE-kodierte T3SS überprüft, wie für NleI (Li *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte zum Teil kein Effekt auf die Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes von Säugetieren und die Pathogenese nachgewiesen werden, wie im Fall von NleC und NleD (Marchés *et al.*, 2005) sowie EspK (Vlisidou *et al.*, 2006). Dagegen scheint NleB eine wichtige Virulenzdeterminante darzustellen, deren Funktion allerdings unbekannt ist (Kelly *et al.*, 2006). Genauer charakterisiert sind die phagenkodierten Effektorproteine Cif, TccP/EspF_U, EscJ und NleA/Espl.

1.3.6.1. „Cycle Inhibiting Factor“

Der „Cycle Inhibiting Factor“ Cif stellt ein bakterielles Zyklomodulin dar, dessen kodierendes Gen im Genom eines intakten Bakteriophagen des Kaninchen-enteropathogenen *E. coli* O103:H2 Stammes E22 identifiziert wurde. Cif induziert einen irreversiblen zytopathischen Effekt, der neben der Umordnung des Aktin-Zytoskeletts durch die Hemmung der Zellteilung charakterisiert ist (Marchés *et al.*, 2003). Cif verhindert die Dephosphorylierung der „Cyclin-dependent Kinase“ Cdk1. Dies führt zur Ansammlung inaktiver Cdk1, wodurch die Mitose am Übergang der G₂- zur M-Phase unterbunden wird, ähnlich wie es durch das „Cytolethal Distending Toxin“ zu beobachten ist. Allerdings schädigt Cif nicht die DNA der Wirtszelle, wie es bei CDT der Fall ist. Der Signalweg, über den Cif in den Zellzyklus eingreift ist jedoch noch unbekannt (Marchés *et al.*, 2003; Taieb *et al.*, 2006).

1.3.6.2. „Tir Cytoskeleton Coupling Protein“

Das „Tir Cytoskeleton Coupling Protein“ TccP, dessen Gen am 5'-Ende des kryptischen Prophagen CP-933U des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 identifiziert wurde, trägt synonym die Bezeichnung EspF_U, da es zeitnah von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Garmendia *et al.*, 2004; Campellone *et al.*, 2004). TccP spielt eine Rolle in der Aktin-Polymerisation, dessen Funktion in EPEC durch das Adapterprotein Nck vermittelt wird. Nck verbindet das Tyrosin-phosphorylierte Protein Tir mit dem neuronalen Wiskott-Aldrich Syndrom Protein (N-WASP). Daraufhin wird der „Actin-related Protein 2/3“ (Arp2/3) Komplex aktiviert und dies führt schließlich zur Einlagerung von Aktin-Filamenten unterhalb des angelagerten Bakteriums. In EHEC vermittelt TccP indirekt die Bindung von dephosphoryliertem Tir an N-WASP und ermöglicht so die Aktivierung von Arp2/3. Dabei ist TccP an N-WASP gebunden, aber das Protein, das Tir an diesen Komplex anlagert, ist derzeit noch unbekannt (Garmendia *et al.*, 2004; Campellone *et al.*, 2004). Laut einer Studie zur Verbreitung des Gens *tccP*, kommt es vor allem in EHEC O157-Stämmen vor. Es ist allerdings auch in einer geringeren Anzahl von nicht-O157 EHEC- und in verschiedenen EPEC-Stämmen zu finden (Garmendia *et al.*, 2005b). Diese *tccP*-positiven EPEC Stämme sind in der Lage simultan sowohl den Nck-vermittelten, als auch den TccP-vermittelten Signaltransduktionsweg zur Umstrukturierung des Aktin-Zytoskeletts zu nutzen (Whale *et al.*, 2006).

1.3.6.3. *E. coli* sekretiertes Protein J

Das kodierende Gen von EspJ ist zusammen mit *tccP* in einem Operon im Genom des kryptischen Prophagen CP-933U des *E. coli* Stammes EDL933 lokalisiert. Die Transkription dieses Operons wird unabhängig von Ler reguliert (Garmendia und Frankel, 2005). Untersuchungen *in vivo* von EspJ zeigten einen Einfluss dieses Proteins auf die Persistenz der pathogenen Bakterien im Gastrointestinaltrakt des Wirtes. Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass EspJ am Überleben des Wirtes und der weiteren Pathogenübertragung beteiligt ist (Dahan *et al.*, 2005).

1.3.6.4. Nicht-LEE-kodierter Effektor A

Das außerhalb des LEE kodierte Effektorprotein NleA wurde ebenfalls zeitnah von zwei Arbeitsgruppen im Genom von *C. rodentium* beschrieben und wird daher auch als EspI bezeichnet (Gruenheid *et al.*, 2004; Mundy *et al.*, 2004b).

Mundy *et al.* (2004a) untersuchten die Verbreitung des Gens *nleA/espI* sowohl in 232 humanen EPEC- als auch in 93 EHEC-Stämmen. Von diesen Stämmen trugen 124 EPEC- und 43 EHEC-Isolate das Gen *eae*, das einen Marker für die Anwesenheit des LEE darstellt. Das kodierende Gen für NleA konnte in 53,4% der *eae*-positiven EPEC- und in 86% der *eae*-positiven EHEC-Stämme nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich eine stärkere Assoziation von *nleA* mit Isolaten von Patienten, die schwerwiegendere Krankheitssymptome aufwiesen (Mundy *et al.*, 2004a).

Darüber hinaus konnten Gruenheid *et al.* (2004) zeigen, dass NleA ein integrales Membranprotein zu sein scheint und nach der Translokation in eukaryotische Wirtszellen in unmittelbarer Umgebung des Golgi-Apparates lokalisiert ist. Außerdem scheint das Chaperon CesT für eine effiziente Sekretion von NleA notwendig zu sein (Thomas 2005). Untersuchungen am Mausmodell weisen auf eine Funktion von NleA bei der Kolonisierung des Gastrointestinaltraktes und der bakteriellen Pathogenese hin. Daher wird NleA als wichtige Virulenzdeterminante angesehen, deren genaue Funktion bisher allerdings noch ungeklärt ist (Gruenheid *et al.*, 2004; Mundy *et al.*, 2004b).

2. Ziele der Arbeit

Shiga Toxin-konvertierende Bakteriophagen spielen wahrscheinlich eine Schlüsselrolle bei der Entstehung neuer pathogener STEC. Sie weisen neben ihrer konservierten lambdoiden Genomstruktur ein breites Spektrum an genetischer Diversität auf. Zur Charakterisierung weiterer Vertreter dieser Phagengruppe war ein Ziel dieser Arbeit die Überarbeitung der Sequenzen und Identifizierung offener Leserahmen des induzierbaren Phagen BP-4795 und des defekten, sogenannten kryptischen Prophagen CP-1639. Es sollten ihre genauen chromosomalen Integrationsstellen bestimmt werden. Des Weiteren weist die Sequenz des Phagen CP-1639 in unmittelbarer Umgebung des Integrase-kodierenden Gens drei unbekannte Leserahmen auf. Im Zuge dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob diese Leserahmen zu dem Phagen CP-1639 gehören oder ein eigenständiges genetisches Element darstellen.

Die Untersuchung der Sequenz des Phagen BP-4795 führte zur Identifikation eines potentiellen Typ III Effektorproteins, das als NleA₄₇₉₅ bezeichnet wurde. Derartige Effektorproteine werden über ein Typ III Sekretionssystem vom Bakterium direkt in eine eukaryotische Wirtszelle transportiert, um deren Metabolismus zu verändern. Dies leistet einerseits einen Beitrag für das Überleben des Bakteriums und zum anderen stellen Effektorproteine häufig wichtige Virulenzfaktoren dar, die zum Teil essentiell für die Pathogenität der STEC sind. Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob der Stx1-konvertierende Phage BP-4795 tatsächlich ein funktionelles Typ III Effektorprotein kodiert. Darüber hinaus sollte die Lokalisation von NleA₄₇₉₅ nach dem Transport in eukaryotische Zellen untersucht werden, um eine mögliche Funktion ableiten zu können.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellte die Untersuchung der Verbreitung und möglichen Diversität des Gens *nleA*₄₇₉₅ innerhalb verschiedener Serogruppen pathogener *E. coli* dar. Anhand der ermittelten epidemiologischen Daten sollte die Bedeutung des Tierreservoirs für die Übertragung *nleA*₄₇₉₅-tragender Bakterien und zum einen eine mögliche Assoziation des Auftretens dieses Effektors mit der Krankheitssymptomatik verschiedener Patienten beurteilt werden. Zum anderen sollte das Vorkommen von NleA₄₇₉₅ im Zusammenhang mit weiteren Virulenzfaktoren untersucht werden. Weiterhin sollte die Möglichkeit der Verbreitung durch horizontalen Gentransfer überprüft werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Es wurden Feinchemikalien der Sigma-Aldrich GmbH (Selze), Merck KG aA (Darmstadt), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) und MP Biomedicals GmbH (Eschwege) verwendet. Für Arbeiten mit DNA wurde das sterile DNase- und RNase-freie destillierte Wasser UltraPure™ der Invitrogen GmbH (Karlsruhe) genutzt.

3.1.2. Enzyme und Desoxynukleotidtriphosphate

Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main)
Taq DNA Polymerase	Promega GmbH (Mannheim)
Taq Polymerase S	Genaxxon Bioscience (Biberach)
AmpliTaq® DNA Polymerase	Applied Biosystems, Applera GmbH (Darmstadt)
PCR Nukleotidmix (10 mM jedes dNTP)	Promega GmbH (Mannheim)
100 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Genaxxon Bioscience (Biberach)
Exonuclease I	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Desoxyribonuklease I (DNase I)	Sigma-Aldrich GmbH (Selze)
Ribonuklease A (RNase A)	Sigma-Aldrich GmbH (Selze)

3.1.3. Größenstandards

DNA

SmartLadder (200-10000 bp)	Eurogentec (Seraing, Belgien)
SmartLadder SF (100-1000 bp)	Eurogentec (Seraing, Belgien)
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (250-10000 bp)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder (80-1031 bp)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Lambda Mix Marker, 19 (1503-48502 bp)	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

Protein

MultiMark® Multi-Colored Standard

Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

PageRuler™ Prestained Protein Ladder

Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

3.1.4. Antikörper zur Western Blot Analyse

Der monoklonale murine Anti-HA Antikörper wurde aus einem 12CA5 Hybridoma-Zellkulturüberstand gewonnen und war in RPMI1640-Medium mit L-Glutamin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), versetzt mit 10% FKS, sowie Penicillin und Streptomycin, gelöst. Dieser Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn PD Dr. Dirk Lindemann (Institut für Virologie, Technische Universität, Dresden) zur Verfügung gestellt. Die Lagerung der Antikörper erfolgte bei –20 °C.

Tabelle 1: Übersicht der in der Western Blot Analyse eingesetzten Antikörper.

Bezeichnung	Beschreibung	Verdünnung	Firma
Mouse Anti-HA (12CA5)	monoklonal primärer Antikörper	1:10	Roche Diagnostics GmbH (Penzberg)
Goat Anti-mouse IgG + IgM (H+L)	Peroxidase-konjugiert sekundärer Antikörper	1:100	Pierce Biotechnology Inc. (Rockford, USA)
ECL™ Anti-Mouse IgG (whole antibody)	Peroxidase-konjugiert sekundärer Antikörper	1:5000	GE Healthcare GmbH (Freiburg)

3.1.5. Oligonukleotide

Für die Herstellung der Oligonukleotide zur Überprüfung und Vervollständigung der Sequenz des Phagen CP-1639 diente die bereits bekannte DNA-Sequenz (Köhler, 2001; Hempel, 2003) als Matrize. Mit Hilfe des sogenannten „Primer walking“-Verfahrens wurde der Gegenstrang zu der von Hempel (2003) untersuchten Sequenz analysiert.

Alle weiteren im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in den Kapiteln 3.2.2.4. und 3.2.2.11. aufgeführt.

3.1.6. *E. coli* Stämme

Zusätzlich zu den nachfolgend aufgelisteten Stämmen wurden verschiedene *E. coli* Isolate aus der Stammsammlung von Prof. Dr. Herbert Schmidt (Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim, Stuttgart) verwendet. Diese sind mit ihrem relevanten Geno- und Serotyp unter den entsprechenden Kapiteln 4.1.3. und 4.3.3. in den Tabellen 9 und 12 beschrieben.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete und konstruierte *E. coli* Stämme.

Stamm	Genotyp	Serotyp	Referenz
C600	<i>supE44, hsdR, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21</i>		Appleyard, 1954
1639/77	<i>stx₁, eae-θ</i>	O111:H ⁻	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
2905/96	<i>stx₁</i>	O103:H2	Schmidt <i>et al.</i> , 1999
4795/97	<i>stx₁, eae-ζ</i>	O84:H4	Zhang <i>et al.</i> , 2002b
4795Δ <i>escN</i>	<i>stx₁, eae-ζ, ΔescN</i>	O84:H4	diese Arbeit
4795/HACH14-5	<i>stx₁, eae-ζ, nleA₄₇₉₅::HA</i>	O84:H4	diese Arbeit
4795Δ <i>escN</i> /HACH2-11	<i>stx₁, eae-ζ, ΔescN, nleA₄₇₉₅::HA</i>	O84:H4	diese Arbeit
EDL933	<i>stx₁, stx₂, eae-γ</i>	O157:H7	O'Brien <i>et al.</i> , 1984
RDEC-1	<i>eae-β</i>	O15:H ⁻	Cantey und Blake, 1977
6044/95	<i>eae-κ</i>	O118:H5	Zhang <i>et al.</i> , 2002b
PMK5	<i>stx₁, eae-ε</i>	O103:H2	Mariani-Kurkdjian <i>et al.</i> , 1993
CF11201	<i>eae-η</i>	O125:H ⁻	Forestier <i>et al.</i> , 1989
7476/96	<i>eae-ι</i>	O145:H4	Zhang <i>et al.</i> , 2002b
CL37	<i>stx₁, eae-θ</i>	O111:H8	Karmali <i>et al.</i> , 1983b

3.1.7. Plasmide und Cosmide

Die Genkarten, der im Verlauf dieser Arbeit konstruierten Plasmide befinden sich im Anhang unter den Abbildungen Anhang 1 und 2.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Cosmide und Plasmide, sowie hergestellte Plasmide.

Bezeichnung	Resistenz	Beschreibung	Referenz
c10D7	<i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	SuperCos 1 mit CP-1639 Genom bis ORF 11	Köhler, 2001
c23C6	<i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	SuperCos 1 mit CP-1639 Genom bis ORF 41	Köhler, 2001
c24F6	<i>amp^R</i> , <i>neo^R</i>	SuperCos 1 mit CP-1639 Genom ab ORF 23	Köhler, 2001
pBluescriptIIKS+	<i>amp^R</i>	Klonierungsvektor, hohe Kopienzahl	Alting-Mees und Short, 1989
pWSK29	<i>amp^R</i>	Klonierungsvektor, geringe Kopienzahl	Wang und Kushner, 1991
pK18	<i>kan^R</i>	Klonierungsvektor	Pridmore, 1987
pKD46	<i>amp^R</i>	Arabinose-induzierbares λ Red-Rekombinasesystem, Temperatursensitiv	Datsenko und Wanner, 2000
pKD3	<i>amp^R</i> , <i>cam^R</i>	FRT Site-flankierte Cam- Kassette	Datsenko und Wanner, 2000
pKD4	<i>amp^R</i> , <i>kan^R</i>	FRT Site-flankierte Kan- Kassette	Datsenko und Wanner, 2000
pCP20	<i>amp^R</i> , <i>cam^R</i>	FLP-Rekombinase, Temperatursensitiv	Datsenko und Wanner, 2000
pSU314	<i>amp^R</i> , <i>cam^R</i>	HA-FRT Site-Cam-FRT Site- Kassette	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
pSU315	<i>amp^R</i> , <i>kan^R</i>	HA-FRT Site-Kan-FRT Site- Kassette	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
pLB15	<i>amp^R</i>	HA-markiertes <i>nleA</i> ₄₇₉₅ in pBluescriptIIKS+	diese Arbeit
pLW1	<i>amp^R</i>	HA-markiertes <i>nleA</i> ₄₇₉₅ in pWSK29	diese Arbeit

amp^R: Ampicillinresistenz, *cam^R*: Chloramphenicolresistenz, *kan^R*: Kanamycinresistenz,
neo^R: Neomycinresistenz

3.1.8. Medien

LB-Medium:	Bacto™ Trypton	1,0% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	1,0% (w/v)

Das Medium wurde mit 1 M NaOH auf pH 7,5 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Für feste Nährmedien wurde dem LB-Medium 1,5% (w/v) Agar, für Weichagar 0,7% (w/v) Agar vor dem Autoklavieren zugesetzt.

NZY-Medium:	Bacto™ Trypton	1,0% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	NaCl	0,5% (w/v)

Das Medium wurde mit 1M NaOH auf pH 7,5 eingestellt, autoklaviert und im Anschluss folgende Substanzen sterilfiltriert zugegeben:

MgCl ₂	12,5 mM
MgSO ₄	12,5 mM
Glukose	20,0 mM

SOC-Medium:	Bacto™ Trypton	2,0% (w/v)
	Hefeextrakt	0,5% (w/v)
	Glukose	20,0 mM
	KCl	2,5 mM
	NaCl	10,0 mM

Das Medium wurde autoklaviert und anschließend folgende Substanzen sterilfiltriert zugegeben:

MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM

5 x M9-Salze:	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O	6,4% (w/v)
	KH ₂ PO ₄	1,5% (w/v)
	NH ₄ Cl	0,5% (w/v)
	NaCl	0,25% (w/v)

M9-Minimalmedium:	5 x M9-Salze	20% (v/v)
	Glukose	0,4% (w/v)
	Casamminosäuren	0,1% (w/v)
	NaHCO ₃	44 mM
	MgSO ₄	2 mM

3.1.9. Antibiotika

Ampicillin und Kanamycin wurden in dem sterilen Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), Chloramphenicol in 100% (v/v) Ethanol gelöst und bei –20 °C gelagert. Norfloxacin wurde in 100% (v/v) Eisessig gelöst und bei 4 °C gelagert.

Tabelle 4: Eingesetzte Antibiotika und deren Konzentrationen.

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml	100 µg/ml
Chloramphenicol	20 mg/ml	20 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml
Norfloxacin	25 mg/ml	0,05-0,25 µg/ml

3.2. Methoden

3.2.1. Kulturtechnische Arbeitsmethoden

3.2.1.1. Kultivierung von Bakterien

Alle Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten unter einer sterilen Sicherheitswerkbank der Klasse 2. Die verwendeten Bakterienstämme wurden auf festem bzw. in flüssigem LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Enthielten die Stämme temperatursensitive Plasmide, erfolgte die Kultivierung bei 30 °C. Bei Bedarf wurde dem Medium ein Antibiotikum in definierter Konzentration zugesetzt. Die Herstellung von Übernachtskulturen erfolgte durch Einreiben von 1-2 Bakterienkolonien in 10 ml LB-Flüssigmedium in einem Erlenmeyerkolben und anschließender Inkubation auf einem Schüttelinkubator bei 180 rpm.

3.2.1.2. Kultivierung von Bakterien unter T3SS-induzierenden Bedingungen

Zur Induktion des T3SS wurden die Bakterienzellen einer Übernachtskultur in LB-Medium mit Hilfe einer Zentrifugation bei 3500 rpm für 5 min geerntet. Das Zellsediment wurde einmal mit M9-Minimalmedium gewaschen und danach in 10 ml dieses Mediums resuspendiert. Anschließend wurden 40-50 ml M9-Minimalmedium mit einer 1:100 Verdünnung dieser Kultur angeimpft und ohne Schütteln bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank (HERAcell®, Thermo Electron, Langenselbold) inkubiert. Bei Bedarf wurde dem Medium ein Antibiotikum in definierter Konzentration zugesetzt.

3.2.1.3. Konservierung von Bakterien

Die Lagerung der Bakterienstämme erfolgte in Form von Glycerinkonserven. Der zu konservierende *E. coli*-Stamm wurde auf einer über Nacht inkubierten LB-Agarplatte vorsichtig in 2 ml PBS resuspendiert. Anschließend wurden 400 µl der Bakterien suspension mit 600 µl 80% (v/v) sterilem Glycerin vorsichtig in einem sterilen Kryoröhrchen gut gemischt und bei -80°C eingefroren.

PBS: 170 mM NaCl; 3,3 mM KCl; 1,8 mM KH₂PO₄; 13 mM Na₂HPO₄

3.2.1.4. Präparation von Phagenlysat

Für die Präparation von Phagenlysat wurden 200 ml, 5 mM CaCl₂ enthaltendes, LB-Medium mit einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stammes auf eine OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und im Anschluss bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 wurde der Kultur erneut 5 mM CaCl₂, sowie 0,05-0,25 µg/ml Norfloxacin zur Induktion des lytischen Phagenzyklus zugesetzt und erneut über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die gesamte Kultur in einen Zentrifugenbecher überführt und bei 7500 × g für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand durch einen Faltenfilter (Ø 185 mm, 595 ½, Whatman GmbH, Dassel) in einen neuen Zentrifugenbecher überführt, DNase I und RNase A in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugesetzt. Nach einer Inkubation des Ansatzes für 45 min bei 37°C im Wasserbad wurde zum Ausfällen bakterieller DNA und RNA 5,8% (w/v) NaCl₂ zugegeben, dieses vollständig gelöst

und die Lösung für 1 h auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei $7500 \times g$ für 10 min bei 4°C und Überführung des Überstandes in einen neuen Zentrifugenbecher wurde 10% (w/v) Polyethylenglykol 6000 zum Ausfällen der Phagenpartikel zugesetzt und bei Raumtemperatur (RT) vollständig gelöst. Nach einer Inkubation von 1 h in Eiswasser wurde der Ansatz bei $9500 \times g$ für 30 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das erhaltene Phagenlysats-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss in 1 ml SM-Puffer aufgenommen.

SM-Puffer: 100 mM NaCl_2 ; 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 8 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,01% (w/v) Gelatine

3.2.1.5. Transduktion und Plaquetest

Zur Transduktion wurden 100 μl des zuvor präparierten Phagenlysates mit 100 μl Bakterienkultur des *E. coli* Stammes C600/pK18 in der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} 0,6-0,8) gemischt und 2 μl 1 M CaCl_2 zugesetzt. Der Ansatz wurde für 4 h bei 37°C ohne Schütteln inkubiert und anschließend 4 ml LB-Medium mit Kanamycin, sowie 20 μl 1 M CaCl_2 zugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 48 h bei 37°C und 180 rpm folgte eine Zentrifugation bei $3500 \times g$ für 30 min bei 4°C . Das erhaltene Pellet wurde resuspendiert, auf LB-Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für den Plaquetest wurden 100 μl verschiedener Verdünnungen des zuvor präparierten Phagenlysats, 100 μl Kultur des *E. coli* Stammes C600/pK18 in der logarithmischen Wachstumsphase (OD_{600} 0,6-0,8) und 20 μl 1 M CaCl_2 gemischt. Dieser Ansatz wurde zu 4 ml erwärmtem, flüssigem LB-Weichagar gegeben, mit dieser Kultur sofort eine LB-Agarplatte gleichmäßig überschichtet und nach dem Abkühlen des LB-Weichagars die Platte über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.2.1.6. Infektion eukaryotischer Zellen und Detektion translozierter Proteine durch Immunfluoreszenz

Die Translokation eines bakteriellen Proteins nach Infektion eukaryotischer Zellen wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Hensel, von Dr. Volker Kuhle am Institut für klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der

Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg mittels Immunfluoreszenz untersucht.

HeLa-Zellen der Linie ATCC-Nr. CCL-2 wurden auf Deckgläschen in „Dulbeccos Modified Eagle Medium“ (DMEM) mit 10% FKS und 1% Glutamin bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank angezogen. Zur Infektion wurden Übernachtskulturen der entsprechenden *E. coli* Stämme in LB-Medium mit Antibiotikazusatz verwendet. Diese Kulturen wurden mit PBS verdünnt, um ein Mengenverhältnis von Bakterien zu eukaryotischen Zellen, die sogenannte „multiplicity of infection“ (MOI), von 10 zu erreichen. Für die Infektion wurden die Bakteriensuspensionen direkt zu den HeLa-Zellen gegeben und weiterhin bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen 6 h nach der Infektion mit 3% Paraformaldehyd in PBS für 15 min bei RT fixiert. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation für 10 min bei RT mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) in PBS. Anschließend wurden die Zellen erneut einmal mit PBS gewaschen und für 1 h bei RT mit dem primären monoklonalen Ratten Anti-HA High Affinity Antikörper (Klon C3F10) (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) inkubiert, der 1:500 in Blockierungslösung verdünnt war. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte eine Inkubation der Zellen mit dem sekundären Antikörper Cy3 Affini Pure Goat Anti-Rat IgG (H+L) (min X Hu, Bov, Hrs Sr Prot) (Jackson Immuno Research Europe Ltd., Suffolk, UK), der ebenfalls 1:500 in Blockierungslösung verdünnt war. In der selben Art wurde das Trans-Golgi Netzwerk angefärbt. Dazu dienten der primäre monoklonale Anti-Golgin-97 Mouse IgG₁ Antikörper CDF4 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) und der sekundäre Antikörper Cy2 Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (min X Hu, Bov, Hrs Sr Prot) (Jackson Immuno Research Europe Ltd.). Nach der Immunfärbung wurden die Zellen abschließend dreimal mit PBS gewaschen, die Deckgläschen mit Fluoprep (bioMérieux sa, Marcy l'Étoile, Frankreich) auf Objektträger aufgebracht und mit Entellan (Merck KG aA, Darmstadt) abgedichtet. Die Untersuchung der Objektträger erfolgte mit Hilfe des Mikroskops Axiovert (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena).

PBS: 170 mM NaCl; 3,3 mM KCl; 1,8 mM KH₂PO₄; 13 mM Na₂HPO₄

Blockierungslösung: 10% (v/v) Ziegenserum; 1% (w/v) BSA; 0,1% (w/v) Saponin in PBS

3.2.2. Gentechnische Arbeitsmethoden

3.2.2.1. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Entsprechend der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurden 0,8% (w/v) oder 2% (w/v) Agarose in 1 × TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und nach Abkühlung in einen vorbereiteten Gelträger gegossen. Die DNA-Proben (10-30 µl) wurden mit 2 µl Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen aufgetragen und bei einer Spannung von 100 V bis 120 V in 1 × TAE-Puffer aufgetrennt. Zusätzlich wurden 5-8 µl DNA-Größenstandard aufgetragen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die DNA-Banden im Gel für 20-30 min in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) gefärbt und mit Hilfe eines Geldokumentationssystems dokumentiert.

50 × TAE-Puffer: 2 M Tris; 0,1 M EDTA (pH 8,0); 5,71% (v/v) Eisessig

Ladepuffer: 70% (v/v) Glycerin; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 0,02%
 (w/v) Xylencyanol; 0,1% (w/v) SDS; 25 mM EDTA (pH 7,5)

3.2.2.2. Restriktionsspaltungen der DNA

DNA-Restriktionen wurden mit dem entsprechenden 10 × Enzympuffer (Endkonzentration 1 ×) und sterilem Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in einem Gesamtvolumen von 10-50 µl durchgeführt. Bei Einsatz zweier Restriktionsenzyme wurde der Puffer genutzt, der die höchste Aktivität beider Enzyme gewährleistete. Das Restriktionsenzym (Richtwert 3 Units pro µg DNA) wurde zuletzt hinzugefügt. Die Inkubation des Reaktionsansatzes erfolgte bei der vom Hersteller des Enzyms angegebenen Temperatur für 1 h oder über Nacht.

3.2.2.3. Reinigung von DNA-Fragmenten

Wenn erforderlich wurden DNA-Fragmente nach der PCR oder Restriktionsspaltung mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ der Firma QIAGEN GmbH (Hilden) laut Angaben des Herstellers gereinigt und mit 30-40 µl sterilen Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) eluiert.

Zur Aufreinigung im Vorfeld einer Sequenzierreaktion wurden 5 µl des entsprechenden PCR-Produkts mit 2 µl SAP und 0,5 µl Exonuklease I gemischt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 37°C und im Anschluss für 15 min bei 80°C inkubiert.

Nach der Amplifikation mehrerer PCR-Produkte wurden die entsprechenden Banden zur Sequenzierung aus einem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN GmbH nach Angaben des Herstellers extrahiert und in 30 µl sterilen Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH) eluiert.

3.2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die DNA-Amplifikation mittels PCR erfolgte in einem Gesamtvolumen von 50 µl für den Nachweis bzw. in 100 µl zur Klonierung, Restriktionsspaltung oder Sequenzierung eines bestimmten Gens. Für den Reaktionsansatz dienten als Matrizen-DNA 5-10 µl einer Bakteriensuspension (1-3 Einzelkolonien in 50 µl 150 mM NaCl) oder 20-100 ng zuvor gereinigte Plasmid-DNA. Des weiteren wurden je 0,2 mM bzw. 0,4 mM (bei erwarteten PCR-Fragmenten über 2 kb) dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 0,6 µM des Oligonukleotids 1 und 2, der entsprechende 10 × PCR-Puffer (Endkonzentration 1 ×) und 1,5-2,5 U der zugehörigen DNA Polymerase eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit sterilen Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) auf das Endvolumen aufgefüllt. Bei Verwendung von AmpliTaq® DNA Polymerase (Applied Biosystems, Applera GmbH, Darmstadt) oder bei erwarteten PCR-Produkten über 2 kb wurden dem Ansatz zusätzlich 2,3 mM MgCl₂ zugegeben.

Die Standard-PCR wurde wie folgt durchgeführt. Nach dem ersten Schritt von 5 min bei 94°C folgten 30 Zyklen, bestehend aus einem Denaturierungsschritt (94°C, 30 s), einem Annealingschritt (Temperatur je nach Zielsequenz gemäß Tab. 5-7, 60 s) und einem Elongationsschritt (72°C, Zeit je nach Zielsequenz gemäß Tab. 5-7). Die PCR-Reaktion wurde mit einer Elongation für 5 min bei 72°C beendet. Die zur PCR verwendeten Oligonukleotide, deren Parameter, sowie abweichende PCR-Bedingungen sind in den Tabellen 5 bis 7 aufgeführt. Weiterhin wurde vermerkt, wenn ein Oligonukleotid auch zur Sequenzierung eingesetzt wurde.

Tabelle 5: Verwendete Oligonukleotide zur Untersuchung des integrativen Elementes und deren Parameter für die entsprechende PCR-Reaktion.

Oligonukleotid		Ziel- sequenz	PCR-Bedingungen		PCR- Produkt- länge	Referenz
Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')		Annealing- temperatur	Elongations- zeit		
p23E35* p23F82-fwd-1*	GGTTATCATAGCAAATTCTGGTC GTTTATGCCTTTCACTTTCTCAG	cuo	59 °C	180 s	2194 bp	Köhler, 2001
B2656 B2657	TGGGGGTAGTGGTAAAAATGAC TAGTATTGTGTAACCGCTCATT	Int1	55 °C	60 s	449 bp	Köhler, 2001
ouo1* B2657*	CGAGACCTTTTATTATTGATT TAGTATTGTGTAACCGCTCATT	Int2	49 °C	120 s	1328 bp	Köhler, 2001
ouo2* pint*	GAAAACGATGGAGATAGGATT ACGAACAGCGGCAGAGGAGTC	Int3	53 °C	120 s	1668 bp	Köhler, 2001
L6-for* pint*	AGAGTTGTGCTGTATATAAAGCC ACGAACAGCGGCAGAGGAGTC	Int4	59 °C	90 s	589 bp	diese Arbeit Köhler, 2001
1639int-for OrfB-rev	CGAGTGGGCAAGCGCTGC GCTGATGGTCGTACGGACC	Int5	57 °C	120 s	1558 bp	diese Arbeit
1639int-for* ssrA-rev*	CGAGTGGGCAAGCGCTGC CTTTAGCAGCTTAATAACCTGC	Int6	57 °C	120 s	1549 bp	diese Arbeit
L4-for* L4-rev*	AAGACGTTTCATGGAATGCAGG TCGACATAGATACAGACCTACC	ORF 5	57 °C	120 s	1531 bp	diese Arbeit

*: Oligonukleotid wurde auch zur Sequenzierung verwendet.

Tabelle 6: Verwendete Oligonukleotide zur Charakterisierung von *nleA*₄₇₉₅, seiner Varianten, sowie der Insertionsstellen von BP-4795 und deren Parameter für die entsprechende PCR-Reaktion.

Oligonukleotid		Ziel-sequenz	PCR-Bedingungen		PCR-Produkt-länge	Referenz
Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')		Annealing-temperatur	Elongationszeit		
ORF83-for2	CCCGAATTCCAGAAGGGCATAAAGCTGCCAAGC	<i>nleA</i> ₄₇₉₅ HA	69 °C	90 s	1777 bp	diese Arbeit
ORF83-HA-rev	CCCTCTAGATTAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGACTCTTGTTTCTCGGATTATATCAAC					
d-escN-for	ATAGGCTTTCAATCGTTTTTTCGTAAGTACTGATATCTTTGGCATGGTCCATATGAATATCCTCC	<i>cam-escN</i> <i>kan-escN</i>	59 °C [#]	120 s	pKD3: 1110 bp pKD4: 1573 bp	diese Arbeit
d-escN-rev	TGTGCCGGCATTATCATTAATTCGTCTACCAGATATGAAGGGCGATTGTGTAGGCTGGAGC					
Z5119-for* Z5119-rev*	CATTGATTCTCTCAATCGGTTTCG TTGTGCGAATACGTTTCGTATTGC	<i>escN</i>	61 °C	120 s	<i>escN</i> : 1754 bp <i>escN::cam</i> : 1543 bp <i>escN::kan</i> : 2006 bp Δ <i>escN</i> : 677 bp	diese Arbeit
Ch-83HA-for	TCAAATTATGTTGATACGGTTGATATAATCCGAGAAACAAGAGTCTATCCGTATGATGTTCTGATTATGCTAGCCTCTAGTAA	<i>cam</i> -HA <i>kan</i> -HA	58 °C [#]	120 s	pSU314: 1142 bp pSU315: 1605 bp	diese Arbeit
Ch-83HA-rev	TTCTGGTGTATTTGTTTTGTGGGGTTTTTAGGAAAAGATGTATTGCATATGAATATCCTCCTTAG					

Fortsetzung **Tabelle 6:**

non83HA-for2* non83-rev*	TGAGCTTAGGTGTATGTGTTTAG TCCACATCGGATATGTGACAC	<i>nleA</i> ₄₇₉₅ HA -chrom	59 °C	120 s	<i>nleA</i> ₄₇₉₅ : 1595 bp <i>nleA</i> ₄₇₉₅ :: <i>cam</i> -HA: 2582 bp <i>nleA</i> ₄₇₉₅ :: <i>kan</i> -HA: 3045 bp <i>nleA</i> ₄₇₉₅ HA _{chr} : 1730 bp	diese Arbeit
intyehv-fwd* intyehv-rev*	GTTTTATCGCAAGCCAGATG TCCTGAATATTCCAGCCAAC	<i>attR</i> ₄₇₉₅	53 °C	60 s	676 bp	Creuzburg <i>et al.</i> , 2005
attL-for* attL-rev*	CCTATCGCACGGGTATTGGC TCAACACGCATAACACCCTCC	<i>attL</i> ₄₇₉₅	59 °C	60 s	769 bp	diese Arbeit
V83-for2* V83-rev2*	ACAGCAACATGCACCGGAATGC CTTCCATCGCACGTATATCAGC	<i>nleA</i> -V2	58 °C	90 s	959 bp-1112 bp	diese Arbeit
V83-for2* V83-rev3*	ACAGCAACATGCACCGGAATGC GATATCGATGACCACATCTTCAGG	<i>nleA</i> -V3	55 °C	90 s	1015 bp-1168 bp	diese Arbeit
VarA-for* VarA-rev*	TATTAAAGCTGTCCACATCGG TGGTGTATTTGTTTTGTGGGG	Var- <i>nleA</i>	50 °C	120 s	1434 bp-1584 bp	diese Arbeit
VarA-for* VarA-rev2*	TATTAAAGCTGTCCACATCGG AGCTTAGACTCTTGTTTCTCG	Var2- <i>nleA</i>	50 °C	120 s	1333 bp-1483 bp	diese Arbeit

#: 25 Zyklen, abweichend von der Standard-PCR; *: Oligonukleotid wurde auch zur Sequenzierung verwendet.

Tabelle 7: Verwendete Oligonukleotide zum Nachweis verschiedener *stx*- und *eae*-Subtypen, sowie deren Parameter für die entsprechende PCR-Reaktion.

Oligonukleotid		Ziel-sequenz	PCR-Bedingungen		PCR-Produkt-länge	Referenz
Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')		Annealing-temperatur	Elongations-zeit		
LIN-1 LIN-2	GAACGAAATAATTTATATGT TTTGATTGTTACAGTCAT	<i>stx</i>	43 °C ^{#a}	90 s	887 bp	Lin <i>et al.</i> , 1993
KS7 KS8	CCCGGATCCATGAAAAAACATTATTAATAGC CCCGAATTCAGCTATTCTGAGTCAACG	<i>stxB</i> ₁	52 °C	40 s	285 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994c
LP43 LP44	ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG GCGTCATCGTATACACAGGAGC	<i>stxA</i> ₂	57 °C	90 s	584 bp	Cebula <i>et al.</i> , 1995
128-1 128-2	AGATTGGGCGTCATTCACTGGTTG TACTTTAATGGCCGCCCTGTCTCC	<i>stx</i> _{2f}	57 °C	60 s	428 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 2000
SK1 SK2	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG	<i>eae</i>	52 °C	60 s	863 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b
SK1 LP4	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGTGATACCAGTACCAATTACGGTC	<i>eae</i> -β	67 °C	150 s	2287 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b Oswald <i>et al.</i> , 2000
SK1 LP5	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC AGCTCACTCGTAGATGACGGCAAGCG	<i>eae</i> -ε	67 °C	120 s	2608 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b Oswald <i>et al.</i> , 2000
SK1 LP3	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC CCCGAATTCTTATTCTACACAAACCGC	<i>eae</i> -γ	52 °C/62 °C ^{#b}	150 s	2792 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b Schmidt <i>et al.</i> , 1993

Fortsetzung **Tabelle 7:**

SK1 LP8	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC TAGATGACGGTAAGCGAC	<i>eae-η</i>	58 °C	150 s	2590 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b Zhang <i>et al.</i> , 2002b
SK1 LP7	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC TTTATCCTGCTCCGTTTGCT	<i>eae-ι</i>	52 °C	150 s	2685 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b Zhang <i>et al.</i> , 2002b
SK1 LP10	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC GGCATTGTTATCTGTTGTCT	<i>eae-κ</i>	52 °C	150 s	2769 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b Zhang <i>et al.</i> , 2002b
SK1 LP11B	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC GTTGATAACTCCTGATATTTTA	<i>eae-θ</i>	45 °C/52 °C ^{#c}	150 s	2686 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b Zhang <i>et al.</i> , 2002b
SK1 LP6B	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC TAGTTGTAATCCCCTTATCC	<i>eae-ζ</i>	51 °C	150 s	2430 bp	Schmidt <i>et al.</i> , 1994b Zhang <i>et al.</i> , 2002b
lerFor lerRev-T	GCTGGGATATACTAATGTGCCTGAT TCTTCTTTCTTCATTCCATTCAAC	<i>ler</i>	58 °C	60 s	156 bp	Hüfner* diese Arbeit
escJFor-T escJRev	ATTGGCTGCTATTTGTTTGAC AACCTCTGGCGAGCTGATGA	<i>escJ</i>	50 °C	60 s	430 bp	diese Arbeit Hüfner*
escVFor escVRev-T	GGGACGCTATTGCTGGTATCA CATCCTTTTCTTTTGTTGACC	<i>escV</i>	52 °C	60 s	1062 bp	Hüfner* diese Arbeit
espA-for espA/D-rev	CTATTATTCACCTACCGTTGTC TAATGTGAGTGCGAGTTCTTC	<i>espA</i>	45 °C	60 s	437 bp	diese Arbeit

*: unveröffentlicht; #: abweichende Zyklenanzahl von der Standard-PCR, z. T. mit veränderter Annealingtemperatur oder -zeit

^a: 40 Zyklen, Denaturierungszeit 60 s, Annealingzeit 90 s; ^b: Annealingtemperatur 52 °C für 3 Zyklen, 62 °C für 28 Zyklen; ^c: Annealingtemperatur 45 °C für 3 Zyklen, 52 °C für 28 Zyklen

3.2.2.5. Präparation von Cosmiden und Plasmiden

Zur Sequenzanalyse von Cosmiden wurden 10 ml einer Übernachtskultur geerntet. Die Präparation erfolgte mit dem „QIAGEN Plasmid Mini Kit“ der Firma QIAGEN GmbH (Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die Cosmid-DNA wurde in 50 µl sterilen Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) aufgenommen.

Zur Klonierung oder Sequenzanalyse wurden für Plasmide mit hoher Kopienzahl 2 ml und für Plasmide mit geringer Kopienzahl 10 ml einer Übernachtskultur geerntet. Die Präparation erfolgte mit dem „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma QIAGEN GmbH nach Angaben des Herstellers. Die Plasmid-DNA wurde in 30-50 µl sterilen Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH) eluiert.

Zur Überprüfung von Plasmiden nach einer Transformation mittels alkalischer Lyse (modifiziert nach Birnboim und Doly, 1979) wurden 2-4 ml einer Übernachtskultur für 3 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in 100 µl Lösung I. Es folgte eine Inkubation von 5 min bei RT. Anschließend wurden 200 µl Lösung II zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurden 150 µl Lösung III zugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, 800 µl 100%iger (v/v) Ethanol zugesetzt und 20 min bei -20 °C inkubiert. Durch eine Zentrifugation für 20 min bei 13000 rpm und 4 °C wurde die DNA pelletiert, im Anschluss einmal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30-50 µl sterilen Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH) aufgenommen.

Lösung I: 50 mM Glukose; 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA

Lösung II: 0,2 M NaOH; 1% (w/v) SDS

Lösung III: 3 M Kaliumacetat; 11,5% (v/v) Eisessig

3.2.2.6. Präparation genomischer DNA

Für die Präparation genomischer DNA wurden 2 ml einer Übernachtskultur bei 6000 rpm für 10 min zentrifugiert, mit 1 ml 150 mM NaCl-Lösung gewaschen, erneut bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 400 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation für 5 min bei RT wurde der Ansatz für 1 min auf 100 °C erhitzt

und anschließend für 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 30 µl 10% (w/v) SDS und 3 µl Proteinase K (20mg/ml) zugegeben und der Ansatz für 1 h bei 56°C inkubiert. Nach der Zugabe von 3 µl RNase A (100 mg/ml) und 200 µl sterilem Wasser folgte eine Inkubation für weitere 30 min bei 37°C. Zur Extraktion der DNA wurde der Ansatz mit 600 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, gemischt, 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die obere wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Die Extraktion wurde 3-4 mal wiederholt bis die wässrige Phase klar blieb. Zur Fällung der genomischen DNA wurde diese anschließend mit 1 ml 100%igem (v/v) Ethanol und 40 µl 3 M Natriumacetat (pH 7,2) versetzt, 30 min bei –20°C inkubiert und bei 13000 rpm für 30 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl sterilen Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) aufgenommen.

STET-Puffer: 233 mM Saccharose; 50 mM Tris-HCl (pH 8,0); 20 mM EDTA (pH 8,0); 5% (v/v) Triton X-100; 1,8 mg/ml Lysozym

3.2.2.7. Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 µl. Die Vektor-DNA und die Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 gemischt. Zu diesem Gemisch wurden steriles Wasser UltraPure™ (Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 10 × T4 DNA Ligasepuffer (Endkonzentration 1 ×) und 20 U T4 DNA Ligase zugegeben. Der Ansatz wurde 18 h bei 16°C inkubiert.

Zur Trennung von PCR-Produkten gleicher Größe für die Sequenzierung wurde die PCR und die anschließende Ligation der Amplifikate in den Vektor pCR®2.1-TOPO unter Verwendung des „TOPO™ TA Cloning®“ Kits der Firma Invitrogen GmbH nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.2.8. Herstellung kompetenter Zellen und Transformation modifiziert nach Hanahan (1983)

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurde eine Übernachtskultur 1:200 in 100 ml LB-Flüssigmedium verdünnt und bei 37°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,6 inkubiert. Danach wurden die Zellen für 15 min auf Eis gestellt und anschließend für 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 40 ml eiskaltem Transformationspuffer (TFB) I resuspendiert, erneut für 5 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert und in 4 ml eiskaltem TFBII aufgenommen. Die kompetenten Zellen wurden in vorgekühlte Eppendorf-Gefäße portioniert und bei –80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden 100 µl kompetenten Zellen mit 25 µl Ligationsansatz vorsichtig auf Eis gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz für 90 s einem Hitzeschock bei 42°C unterworfen und sofort für 2 min auf Eis gestellt. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl NZY-Medium, sowie eine Inkubation für 60 min bei 37°C und 180 rpm. Je 100 µl und die restlichen 500 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Erfolgte die Transformation mit Plasmiden, die zur sogenannten „Blau-Weiß-Selektion“ geeignet waren, wurden die LB-Agarplatten zusätzlich mit 5 µg/ml IPTG und 80 µg/ml X-Gal (gelöst in DMF) versetzt.

TFBI: 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM KAc; 10 mM CaCl₂; 15% (v/v) Glycerin

TFBII: 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 10 mM MES (pH 6,3); 15% (v/v) Glycerin

3.2.2.9. Herstellung elektrokompetenter Zellen und Transformation durch Elektroporation

Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden 50 ml LB-Flüssigmedium mit 500 µl einer Übernachtskultur beimpft und bei 37°C und 180 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 inkubiert. Wenn es sich um einen Stamm handelte, der das Plasmid pKD46 enthielt, wurde dem Medium 10 mM Arabinose zugesetzt und bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen für 15 min auf Eis gestellt und anschließend 15 min bei 5000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde zweimal mit eiskaltem, sterilem destillierten Wasser (50 ml bzw. 25 ml) und einmal

mit 2 ml eiskaltem, sterilen 10%igem (v/v) Glycerin gewaschen. Danach wurde das Pellet in 100 µl eiskaltem, sterilen 10%igem (v/v) Glycerin aufgenommen.

40 µl der elektrokompenten *E. coli*-Zellen wurden mit 2-10 µl DNA vorsichtig auf Eis gemischt und in vorgekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 25 µF, 200 Ω und 2,5 kV (Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Nach der Pulsauslösung wurde sofort 1 ml SOC-Medium zugegeben. Anschließend wurden die Zellen in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und 90 min bei 30°C inkubiert. Je 100 µl und die restlichen 900 µl des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 30°C bzw. 37°C inkubiert.

3.2.2.10. Deletion und Markierung chromosomaler Gene nach Datsenko und Wanner (2000)

Zur Erzeugung von Deletionen oder Fusionen mit dem HA-Epitop im Chromosom wurde die „One-step inactivation“-Methode von Datsenko und Wanner (2000) genutzt. Dieses System beruht auf der Rekombination eines PCR-Produktes, dessen Enden komplementär zu Sequenzen des Zielgens sind, und einem chromosomalem Gen.

In einem ersten Schritt wurde der Stamm, der das zu mutagenisierende Gen trägt, mit dem Plasmid pKD46 transformiert. Auf diesem Plasmid mit temperatursensitiven Replikationsursprung sind die Gene des λ Red-Rekombinasesystems unter Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors kodiert. Anschließend wurde der erhaltene pKD46-tragende Stamm unter Arabinosezusatz mit einem gereinigten PCR-Produkt transformiert. Für die Herstellung dieses PCR-Produktes wurden zur Erzeugung von Deletionen die Plasmide pKD3 bzw. pKD4 und für die Markierung mit dem HA-Epitop die Plasmide pSU314 bzw. pSU315 genutzt. Alle Plasmide tragen eine sogenannte „ELP Recognition Target“ (FRT) Site-flankierte Antibiotikaresistenz-Kassette. Diese Resistenz-Kassetten der Plasmide pSU314 und pSU315 weisen darüber hinaus an einem Ende die Sequenz des HA-Epitops auf. Die jeweilige Kassette wurde mit Hilfe von Oligonukleotiden amplifiziert, die 20 komplementäre Basenpaare zu der Plasmidsequenz und ca. 40 komplementäre Basenpaare zu der 5' bzw. 3' Region der chromosomalen Zielgensequenz besaßen. Die Rekombination des PCR-Produktes in das Bakteriengenom wurde durch die induzierte λ Phagen-Rekombinase vermittelt. Zum

Abschluss wurde der nun erhaltene Stamm mit dem Plasmid pCP20 transformiert. Dieses Plasmid mit temperatursensitivem Replikationsursprung trägt eine FLP-Rekombinase, die den Verlust der Antibiotikaresistenz an den FRT Sites vermittelt. Für alle Transformationen wurde die Elektroporation genutzt. Die erhaltenen Transformanten wurden hinsichtlich der Deletion des entsprechenden Gens mit Hilfe von PCR und DNA-Sequenzierung überprüft.

3.2.2.11. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (1977). Diese wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden mit Hilfe des ABI PRISM™ 377 DNA Sequenzers (Applied Biosystems, Applera GmbH, Darmstadt) und im Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie am Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie der Universität Hohenheim mit dem Kapillar-Sequenzer CEQ™ 8000 (Beckman Coulter GmbH, Krefeld) durchgeführt. Die zur Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 8, sowie in Kapitel 3.2.2.4. in den Tabellen 5 und 6 aufgeführt.

Sequenzierung mit dem ABI PRISM™ 377 DNA Sequenzer: Für den Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden 2 µl DNA (Plasmid- bzw. Cosmid-DNA oder PCR-Produkt), 1,5 µl (10 pmol/µl) Oligonukleotid und 2 µl "Big Dye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix" (Applied Biosystems, Applera GmbH) zugegeben. Die Sequenzierreaktion umfasste 25 Zyklen, bestehend aus einem Denaturierungsschritt für 10 s bei 96°C, einem Annealingschritt für 5 s bei der Annealingtemperatur des verwendeten Oligonukleotids (Tab. 5, 6 und 8) und einem Elongationsschritt für 4 min bei 60°C. Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe eines „AutoSeq™ G-50“-Säulchens der Firma GE Healthcare GmbH (Freiburg) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und in einer Vakuumzentrifuge (MAXI dry lyo, Heto Lab Equipment, Allerød, Dänemark) getrocknet. Das erhaltene Pellet wurde in 2,5 µl Ladepuffer für das Sequenziergel resuspendiert und nach Angaben des Herstellers für die Sequenzierung vorbereitet. Die Auftrennung und Analyse der DNA-Fragmente erfolgte mit dem ABI PRISM™ 377 DNA Sequenzer und zugehöriger Software der Firma Applied Biosystems, Applera GmbH.

Sequenzierung mit dem Kapillar-Sequenzier CEQ™ 8000: Die Sequenzierungsreaktion und ihre Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem „CEQ Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit“ der Firma Beckman Coulter GmbH. Für den Reaktionsansatz in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden zu 50 fmol PCR-Produkt, 1 µl (10 pmol/µl) Oligonukleotid und 2 µl „DTCS Quick Start Master Mix“ zugegeben. Nach der PCR wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stopplösung und 10 µl sterilem Wasser beendet und aufgereinigt. Abweichend von den Angaben des Herstellers erfolgte die Aufreinigung bei Raumtemperatur mit ungekühltem Ethanol. Das erhaltene Pellet wurde in 30 µl „Sample Loading Solution“ resuspendiert und nach Angaben des Herstellers für die Sequenzierung vorbereitet. Die Auftrennung und Analyse der PCR-Fragmente erfolgte mit dem Sequenzier CEQ™ 8000 und zugehöriger Software der Firma Beckman Coulter GmbH.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierungsreaktion.

Oligonukleotid		Annealing- temperatur	Zielsequenz
Bezeichnung	Sequenz (5´-3´)		
L5-for	CTGTTAATTTTCGATGTGGATCG	57 °C	IntE
L6-rev	GTTCCATGATTCAACACCACC	57 °C	IntE
nonPint-for	CAATAAGTTCTTCAGTAGCTGC	57 °C	IntE
nonPint-rev	CATTCAGGGTGCCATAACTCG	59 °C	IntE
DH05 universal [#]	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	69 °C	pUC/M13-Plasmid
B24-Reverse [#]	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	65 °C	pUC/M13-Plasmid
ORF83-Seq	CTTCTCCCGGTCTGATAACC	57 °C*	<i>nleA</i>
83HA-Seq	ACACCACTTACTCCTGATGG	55 °C*	<i>nleA</i>
VarA-Seq	CTCAGATGGCATTAGAAATACC	57 °C*	<i>nleA</i>
Var-Seq1	GCAGATTTAAACAAGGCCGAG	57 °C*	<i>nleA</i>
Var-Seq2	AATAGTGTCTGGCTTTAATCC	53 °C*	<i>nleA</i>
Var-Seq3	GATTACGAACCACTTGAGC	51 °C*	<i>nleA</i>
Var-Seq4	TCTGAGTAACATTGAATAAACC	53 °C*	<i>nleA</i>

*: 50 °C Annealingtemperatur bei PCR-Reaktion für Sequenzier CEQ™ 8000 (Beckman Coulter GmbH); #: Universal-Primer, nicht im Zuge dieser Arbeit generiert

3.2.2.12. Sequenz-Identifikationsnummer

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte DNA-Sequenz des integrativen Elementes des Stammes 2905/96 wurde unter der Identifikationsnummer (accession number) AJ831374 in der Nukleotidsequenz-Datenbank EMBL des „European Molecular Biology Laboratory“ (Cambridge, UK) hinterlegt. Weiterhin wurden die EMBL Nukleotidsequenz-Datenbankeinträge mit den Identifikationsnummern AJ304858 für CP-1639 und AJ556162 für BP-4795 überarbeitet.

3.2.2.13. Southern-Blot Hybridisierung

Für die Southern-Blot Hybridisierung wurden 10 µg geschnittene genomische DNA auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe eines Vakuums von ca. 50 mbar auf eine Nylonmembran übertragen. Dabei wurde das Gel zuerst mit Depurinierungslösung überschichtet bis das Bromphenolblau des Ladepuffers nach gelb umschlug. Anschließend wurde das Gel so lange mit Denaturierungslösung bedeckt bis das Bromphenolblau wieder blau wurde. Es folgte eine Überschichtung des Geles mit Neutralisierungslösung. Diese wurde 10 Minuten länger als die Denaturierungslösung durch das Gel gesaugt. Zuletzt wurde das Gel für 1h mit 20 × SSC bedeckt. Nach Beendigung des Vakuumblots wurde die Membran kurz in 5 × SSC gewaschen und unter einem UV-Transilluminator (365 nm) zur DNA-Fixierung für 3 min mit UV-Licht bestrahlt. Die Hybridisierung der Membran mit einer *nleA*₄₇₉₅-Sonde bei 68 °C über Nacht und die Detektion der DNA erfolgte mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ der Firma Roche Diagnostics GmbH (Penzberg) laut Herstellerangaben. Zur Herstellung der *nleA*₄₇₉₅-Sonde wurde ein zweimal gereinigtes PCR-Produkt des Gens *nleA*₄₇₉₅ unter Verwendung des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ der Firma Roche Diagnostics GmbH nach Herstellerangaben markiert und bei –20 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt. Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte nach Auftrennung in einem Agarosegel mit dem „QIAEX II Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN GmbH (Hilden) laut Herstellerangaben.

Depurinierungslösung:	0,25 M HCl
Denaturierungslösung:	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
Neutralisierungslösung:	1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl (pH 7,5)
20 × SSC:	0,3 M Natriumcitrat; 3 M NaCl

3.2.3. Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

3.2.3.1. Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Zur Fällung von Proteinen aus Kulturüberständen wurden 40 ml einer auf eine OD_{600} von 0,8 eingestellten Bakterienkultur in M9-Minimalmedium unter T3SS induzierenden Bedingungen für 40 min bei $5400 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von $0,45 \mu m$ filtriert. Die Proteinfällung erfolgte nach Zusatz von 0,1 Volumen eiskalter 100%iger (w/v) Trichloressigsäure (TCA) durch eine Inkubation über Nacht auf Eis. Im Anschluss wurden die Proteine für 40 min bei $20000 \times g$ und $4^\circ C$ zentrifugiert, das Pellet einmal mit eiskaltem 100%igem (v/v) Aceton für 20 min bei $15000 \times g$ und $4^\circ C$ gewaschen, luftgetrocknet und in $40 \mu l$ SDS-PAGE Probenpuffer (3.2.3.2.) aufgenommen.

3.2.3.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-PAGE wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene an der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden das System der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) verwendet. In Kooperation mit dem Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim wurden die Proteine nach der Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt.

Es wurden 2 ml einer auf eine OD_{600} von 0,8 eingestellten Bakterienkultur in M9-Minimalmedium unter T3SS induzierenden Bedingungen für 3 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert und das Pellet in $40 \mu l$ SDS-PAGE Probenpuffer aufgenommen. Diese Zellproben, sowie die TCA-gefällten Proteinproben wurden für 10 min bei $100^\circ C$ gekocht und anschließend für 5 min bei $16000 \times g$ zentrifugiert.

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter Verwendung des NuPAGE® Elektrophorese-Systems der Firma Invitrogen GmbH wurden $2,5 \mu l$ Zellysat und $1,5 \mu l$ der TCA-gefällten Proteinproben, sowie $2,5 \mu l$ Protein-Größenstandard auf ein zuvor vorbereitetes 10% NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel (Invitrogen GmbH) aufgetragen und für ca. 90 min bei 200 V und 115 mA in einer mit MES-Puffer (Invitrogen GmbH) gefüllten XCell Sure Lock™ Mini Cell-Kammer (Invitrogen GmbH) aufgetrennt.

Für die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) wurde ein 4% Sammel- und ein 12% Trenngel hergestellt. Nach der gründlichen Reinigung und dem Zusammenbau der Gelkammer wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Dieser wurde nach der Polymerisation vollständig entfernt. Im Anschluss wurde das Sammelgel gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde die Gelkammer in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, diese mit $1 \times$ Laufpuffer gefüllt, 5 μ l der Proteinproben, sowie 10 μ l Protein-Größenstandard aufgetragen und die Proteine bei 25 mA aufgetrennt.

SDS-PAGE Probenpuffer:	50 mM Tris-HCl (pH 6,8); 12,5% (v/v) Glycerin ; 4% (w/v) SDS; 0,01% (w/v) Bromphenolblau; 2% (v/v) β -Mercaptoethanol
Sammelgel (4%):	7,3 ml destilliertes Wasser; 1,33 ml Acrylamid-Lösung Rotiphorese® Gel 30 (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe); 1,25 ml 1M Tris-HCl (pH 6,8); 40 μ l 25% (w/v) SDS; 75 μ l 10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS); 5 μ l TEMED
Trenngel (12%):	6,05 ml destilliertes Wasser; 6 ml Acrylamid-Lösung Rotiphorese® Gel 30 (Carl Roth GmbH + Co. KG); 2,81 ml 2M Tris-HCl (pH 8,8); 60 μ l 25% (w/v) SDS; 75 μ l 10% (w/v) APS; 5 μ l TEMED
$10 \times$ Laufpuffer:	1,92 M Glycin; 0,25 M Tris; 1% (w/v) SDS

3.2.3.3. Western Blot Analyse und immunologische Detektion der Proteine

In einem XCell II™ Blot Modul in einer TBS-Puffer (Invitrogen GmbH) gefüllten Kammer (Invitrogen GmbH) wurden die Proteine für 1 h bei 30 V und 170 mA auf eine Nitrozellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,2 μ m (Invitrogen GmbH) transferiert und für 1 h unter leichtem Schütteln bei RT, wie auch alle nachfolgenden Schritte, in Blocklösung I inkubiert. Nach zweimaligem kurzem Waschen in PBS-T folgte die Inkubation der Membran für 1 h mit dem primären Antikörper der in 5% (w/v) Magermilchpulver, gelöst in $1 \times$ PBS-T, verdünnt war. Danach wurde der Blot dreimal für 5 min in PBS-T gewaschen und im Anschluss für 1 h mit dem sekundären Antikörper (Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) inkubiert, der in $1 \times$ PBS-T mit

10% (v/v) FKS verdünnt war. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 5 min in PBS wurden die Antikörper-bindenden Proteine durch Zugabe von Chlornaphtol-Lösung detektiert. Alle Reaktionsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Im Semi-Dry-Blotverfahren wurden die Proteine für 1 h bei 10 V und 250 mA auf eine, zuvor mit 1 × Transferpuffer angefeuchtete, Nitrozellulose-Membran mit einer Porengröße von 0,45 µm (Hybond™ ECL™, GE Healthcare GmbH, Freiburg) transferiert und für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln in Blocklösung II inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal kurz mit PBS-T gewaschen und für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln mit dem primären Antikörper inkubiert, der in 5% (w/v) Magermilchpulver, gelöst in 1 × PBS-T, verdünnt war. Im Anschluss wurde die Membran unter leichtem Schütteln bei RT, wie alle nachfolgenden Schritte, dreimal für 10 min in PBS-T gewaschen. Es folgte die Inkubation für 1 h mit dem sekundären Antikörper (GE Healthcare GmbH), der ebenfalls in 1 × PBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver verdünnt war. Nach erneutem dreimaligen Waschen für 10 min in PBS-T erfolgte die Detektion der Antikörper-bindenden Proteine unter Verwendung der „ECL™ Western Blotting Detection Reagents“ (GE Healthcare GmbH) nach Angaben des Herstellers.

10 × Transferpuffer:	1,92 M Glycin; 0,25 M Tris
PBS:	170 mM NaCl; 3,3 mM KCl; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; 13 mM Na ₂ HPO ₄
Blocklösung I:	10% (v/v) FKS in PBS
Blocklösung II:	5% (w/v) Magermilchpulver in PBS
PBS-T:	PBS versetzt mit 0,25% (v/v) Tween 20
Chlornaphtol-Lösung:	6 mg 4-Chloro-1-naphthol (gelöst in 2 ml Ethanol); 10 ml PBS; 5 µl 30% (v/v) H ₂ O ₂

3.2.4. Bioinformatik

Zur Überprüfung und Bearbeitung von DNA-Sequenzen wurde das Programm BioEdit (Hall, 1999) genutzt. BioEdit wurde ebenfalls verwendet, um erhaltene Sequenzen zu einer fortlaufenden Konsensussequenz zusammenzufügen.

Die Ermittlung offener Leserahmen erfolgte mit den Programmen EditSeq und MapDraw (DNASTAR, Madison, USA) unter Verwendung von ATG und GTG als Startcodon, sowie GeneMark.hmm (Lukashin und Borodovsky, 1998).

Sequenzvergleiche wurden mit Hilfe der Datenbanken des National Center of Biotechnology Information (NCBI; Bethesda, USA) und den dort verfügbaren BLAST-Algorithmen durchgeführt. Als Suchoption auf Nukleotidebene diente Blastn und auf Aminosäureebene Blastx oder Blastp.

Die Suche nach möglichen Transmembranregionen, Domänen und Sequenzmotiven erfolgte mit Hilfe der Programme TMPRED, MyHits und Motifscan von ch.EMBnet.org des „Swiss Institute of Bioinformatics“ (Schweiz).

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Stx1-konvertierenden Bakteriophagen CP-1639 und BP-4795

4.1.1. Sequenzanalyse von CP-1639 und BP-4795

Die bereits untersuchte Sequenz des kryptischen Prophagen CP-1639, der in das Genom des *E. coli* O111:H⁻ Stammes 1639/77 integriert ist, sollte vervollständigt und korrigiert werden (Köhler, 2001; Hempel 2003). Unter Verwendung des „Primer walking“-Verfahrens wurde der Gegenstrang zu der von Hempel (2003) untersuchten Sequenz des Bakteriophagen CP-1639 analysiert. Des weiteren wurden gezielt Bereiche der bereits von Köhler (2001) ermittelten Sequenz überprüft, wenn Unstimmigkeiten zwischen den Programmen GeneMark.hmm (Lukashin und Borodovsky, 1998) und MapDraw (DNASTAR) auftraten. Mit Hilfe dieser Programme wurden ebenfalls die bereits vorhandenen Sequenzdaten des induzierbaren Phagen BP-4795 des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97 erneut analysiert. Bei Verwendung des Programmes MapDraw (DNASTAR) wurde als Kriterium zur Definition eines offenen Leserahmens (ORF) eine Größe von mindestens 135 bp angesehen und alternative Startcodons berücksichtigt. Des weiteren wurden die Genomsequenzen der Phagen CP-1639 und BP-4795 mit den Datenbanken des „National Center of Biotechnology Information“ (NCBI) abgeglichen. In Abbildung 3 ist die Genanordnung beider Bakteriophagen im Vergleich zu dem Stx1-konvertierenden Phagen VT1-Sakai des *E. coli* O157:H7 Stammes RIMD 0509952 (Yokoyama *et al.*, 2000) dargestellt. Die Positionen, Größen und Sequenzähnlichkeit auf Proteinebene der offenen Leserahmen befinden sich im Anhang in den Tabellen Anlage 1 bzw. 2.

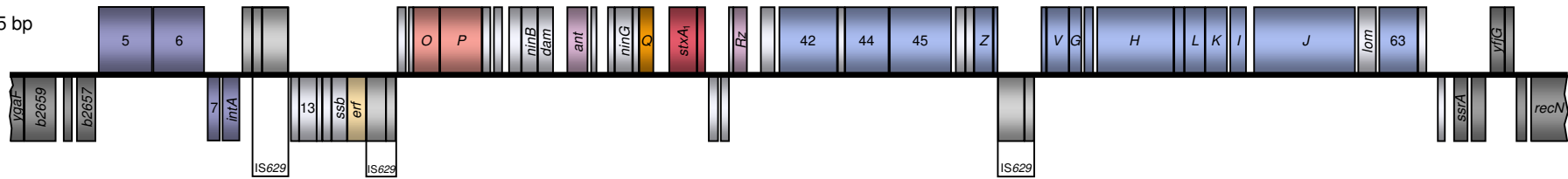
In der überarbeiteten Sequenz des *E. coli* O111:H⁻ Stammes 1639/77 von 50625 bp wurden 71 offene Leserahmen identifiziert, wobei es sich bei ORF 30 und ORF 31 um den unterbrochenen Leserahmen des Gens *roi*, sowie bei ORF 48 und ORF 51 um eine Unterbrechung des Leserahmens des Schwanzfasergenes *U* durch ein IS629-Element handelt (Abb. 3). Den Anfang und das Ende des sequenzierten Bereiches bilden vier bzw. sechs ORFs, die dem Bakteriengenom zugeordnet werden konnten und große Ähnlichkeit zu Genen des apathogenen *E. coli* K-12 Stammes MG1655 (NCBI-Identifikationsnummer: NC_000913) aufweisen. Die ORFs 5 und 6 gleichen zu 41% bzw. 21% Proteinen, die im Genom von *Desulfovibrio vulgaris*

kodiert sind. Im Gegensatz zu dem 981 Aminosäuren umfassenden Protein von *D. vulgaris* besitzt das abgeleitete Protein von ORF 5 nur 614 Aminosäuren, während das hypothetische Produkt von ORF 6 nur acht Aminosäuren kürzer als das entsprechende Protein von *D. vulgaris* ist. Für den ORF 7 konnte keine Homologie in der Datenbank ermittelt werden. Die 4084 bp umfassende Region dieser drei Leserahmen besitzt einen G+C Gehalt von nur 34% im Vergleich zu dem G+C Gehalt von 55% des *E. coli* K-12 Chromosomes. Diese Region, welche ein integratives Element darzustellen scheint, wird von einem verkürzten Integrasegen *intA* (ORF 8) und einem IS629-Element (ORFs 10 und 11) gefolgt. Die ORFs 12 bis 65 konnten aufgrund von Sequenzähnlichkeiten zu phagenkodierten Proteinen in der Datenbank eindeutig dem Stx1-konvertierenden Bakteriophagen CP-1639 zugeordnet werden. In die Sequenz des Phagen von ca. 39445 bp sind zwei IS629-Elemente integriert. Eins befindet sich kurz vor den Genen für die Replikation und das andere im zweiten Schwanzfasergen (Abb. 3). Im Vergleich zu den induzierbaren Prophagen VT1-Sakai und BP-4795 ist die Sequenz von CP-1639 um ca. 8,5 kb bzw. 18,5 kb verkürzt und er besitzt keine Gene für die Immunität und frühe Regulation (Abb. 3). Ebenfalls konnte abgesehen von dem Rekombination-assoziierten ORF17, kein weiteres Gen der für die Rekombination zuständigen Regionen identifiziert werden. Des weiteren fehlen bei CP-1639 Gene der Lysekassette. So konnten zum einen keine offenen Leserahmen für das Holin *S* und das Endolysin *R* identifiziert werden. Zum anderen befindet sich der Leserahmen, der den vermeintlichen Antirepressor Ant kodiert, nicht in der Region in der sich normalerweise die Lysekassette eines Stx-kodierenden Phagen befindet. Vermutlich handelt es sich bei CP-1639 aufgrund des Fehlens dieser wichtigen Gene für den lytischen Lebenszyklus eines Bakteriophagen um einen kryptischen Prophagen, der nicht mehr in der Lage ist das Wirtsgenom zu verlassen.

Für die bereits von Recktenwald (Creuzburg *et al.*, 2005) analysierte 57930 bp umfassende Sequenz des Bakteriophagen BP-4795 wurden 85 offenen Leserahmen ermittelt. Dieser Stx1-konvertierende Phage besitzt im Vergleich zu VT1-Sakai ebenfalls alle Gene, die für einen lytischen Lebenszyklus notwendig sind (Abb. 3). Im Gegensatz zu VT1-Sakai, der nur ein IS629-Element am Beginn der Morphogeneseregion besitzt, enthält das Genom von BP-4795 zwei IS629-Elemente (ORFs 77, 78 und ORFs 81, 82) am Ende dieser Region. Das Genom von BP-4795 ist ca. 10 kb größer als das von VT1-Sakai. Die zwischen und nach den IS629-Elementen

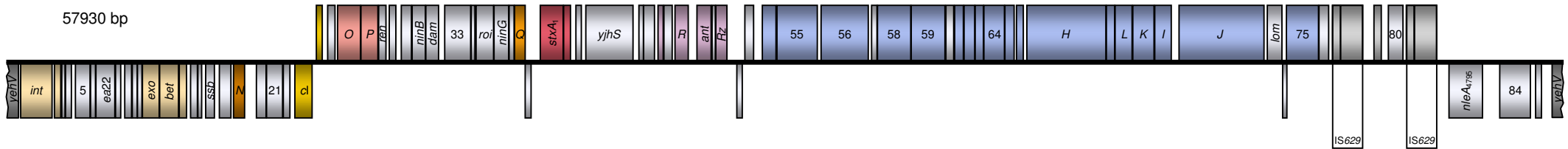
CP-1639

≈ 39445 bp



BP-4795

57930 bp



VT1-Sakai

47900 bp

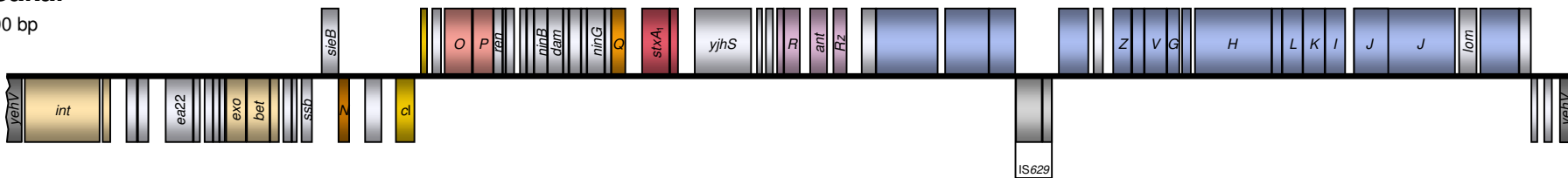


Abbildung 3: Vergleich der Genanordnung der Stx1-kodierenden Bakteriophagen CP-1639 und BP-4795 mit dem Phagen VT1-Sakai (NCBI-Identifikationsnummer: AP000400) und deren Integrationsstellen im Bakteriengenom. Kästchen oberhalb der schwarzen Linie zeigen ORFs in 5'-3' Transkriptionsrichtung an und Kästchen unterhalb der Linie stellen ORFs in 3'-5' Transkriptionsrichtung dar. Durch die verschiedenen Farben sind Gene für die ■ Replikation, ■ Rekombination, ■ Immunität, ■ frühe Regulation, ■ späte Regulation, ■ Lyse, ■ Morphogenese und das ■ Shiga Toxin, weitere ORFs der ■ Phagen, ■ Bakteriengenome, ■ IS-Elemente, sowie des ■ integrativen Elementes gekennzeichnet.

liegenden ORFs scheinen keine ursprünglichen Phagengene zu sein. So wurden drei offene Leserahmen (ORF 80, 83 und 84) identifiziert, deren Produkte Ähnlichkeiten zu Typ III Sekretionssystem (T3SS) assoziierten Proteinen aufweisen (Abb. 3). Bei den anderen zwei Phagen sind solche Leserahmen nicht vorhanden. Der letzte ORF vor dem Übergang in das Bakteriengenom kodiert bei allen drei Phagen für ein Protein mit Ähnlichkeit zu dem bakteriellen DinI. Darüber hinaus besitzt BP-4795 ebenso wie VT1-Sakai einen Leserahmen (ORF 43), der für das Protein YjhS kodiert (Abb. 3). Bei diesem Gen handelt es sich ebenfalls um ein bakterielles Gen, dessen Funktion unbekannt ist. In dem Prophagen CP-1639 kommt dieser offene Leserahmen nicht vor.

4.1.2. Bestimmung der „Attachment Sites“ von CP-1639 und BP-4795

Als Integrationsstellen der Phagen ins Bakteriengenom wurden bereits *ssrA* für CP-1639 von Hempel (2003) und *yehV* für BP-4795 (Creuzburg *et al.*, 2005) ermittelt, allerdings nicht die genauen Insertionsstellen („Attachment Sites“) der beiden Bakteriophagen bestimmt.

Im Bereich des Überganges des integrativen Elementes in das Genom des kryptischen Prophagen CP-1639 ist ein ORF für das Integrasegen *intA* vorhanden (Abb. 3). Falls diese Integrase zu CP-1639 gehört, müsste sich in den Bereichen vor *intA* und am anderen Ende des integrierten Phagengenoms nach *dinI* die Sequenzwiederholung der linken (*attL*) bzw. rechten (*attR*) „Attachment Site“ befinden. Da bei der Auswertung der Sequenzanalyse keine derartige Wiederholung bestimmt werden konnte, wurde die „Attachment Site“ von CP-1639 aufgrund eines Vergleiches mit bekannten „Attachment Site“-Sequenzen im tmRNA Gen *ssrA* (Williams, 2003) ermittelt (Abb. 4). Der Übergangsbereich von Phagen- und Bakteriengenom der „Attachment Site“ umfasst sieben Basenpaare für alle von Williams (2003) charakterisierten Integrasesubfamilien. Von diesen *ssrA*-spezifischen Integrasen nutzt die P4-Subfamilie die sieben Basenpaare umfassende Sequenz am 3'-Ende von *ssrA*. Diese unter anderem im *E. coli* K-12 Stamm MG1655 und *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 vorkommende Sequenz ist identisch zu den Basen der Positionen 46849 bp bis 46855 bp des untersuchten DNA-Abschnittes des *E. coli* O111:H⁻ Stammes 1639/77 (Abb. 4). Zur genaueren Identifizierung wurden die Stämme der GC-reichen Haarnadelstrukturen der faktorunabhängigen Terminatoren

hinzugezogen, da deren Sequenzhomologie höher sein kann, als die Ähnlichkeit zwischen *ssrA* und dem durch eine Integrase der P4-Subfamilie entstandenen kurzen Fragment stromabwärts der *attR* (Williams, 2003). Außer einem einzelnen Basenaustausch von A zu G stimmt die Sequenz des Stammes 1639/77 mit der des Stammes EDL933 überein, der an dieser Stelle die O-Insel #108 trägt (Abb. 4). Aufgrund dieser hohen Übereinstimmungen wurde die Sequenz 3' GCT GGC G 5' als *attR* für den Prophagen CP-1639 bestimmt. Hingegen konnte *attL* nicht ermittelt werden, da dieser Bereich vermutlich aufgrund genetischer Veränderungen nach Insertion von CP-1639 in das Bakteriengenom deletiert wurde.

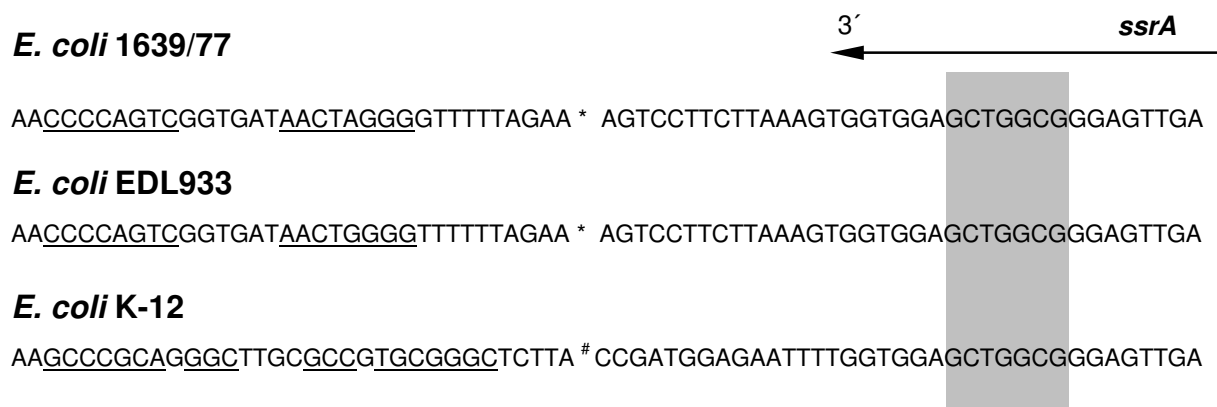


Abbildung 4: Vergleich der DNA-Sequenzen der chromosomalen Region stromabwärts des 3'-Endes von *ssrA* in *E. coli* O111:H⁻ Stamm 1639/77 (Position 46693 bp - 46863 bp), *E. coli* O157:H7 Stamm EDL933 (NCBI-Identifikationsnummer: NC_002655) und *E. coli* K-12 Stamm MG1655 (NCBI-Identifikationsnummer: NC_000913). Die 7 Basenpaare der *attR* sind grau unterlegt und die unterstrichenen Basen zeigen die Stämme der Haarnadelstrukturen der faktorunabhängigen Terminatoren an. Zur übersichtlicheren Darstellung stehen * für 91 fehlende Basenpaare und # für 28 fehlende Basenpaare.

Die Sequenz von BP-4795 wurde nach Subklonierung zuvor präparierter DNA aus intakten Phagen analysiert (Creuzburg *et al.*, 2005), in der aus diesem Grund die Sequenzwiederholung der „Attachment Site“ nur einmal vorhanden war. Daher erfolgte die Bestimmung der „Attachment Site“ von BP-4795 mittels PCR im Stamm 4795/97. Es wurden zwei verschiedene Reaktionen mit den Oligonukleotiden attL-for

und attL-rev bzw. intyehv-fwd und intyehv-rev zur Untersuchung von *attL* und *attR* durchgeführt und die erhaltenen Produkte wurden mit den zuvor verwendeten Oligonukleotiden sequenziert. Bei beiden PCR-Produkten konnte die 20 bp umfassende Sequenz 5' CCT GTC ACG TTA CGC GCG TG 3' ermittelt werden, welche die Sequenzwiederholung von *attL* und *attR* darstellt. Dieser für BP-4795 bestimmte Übergangsbereich von Phagen- und Bakteriengenom ist identisch zu der 20 bp großen „Attachment Site“ des Phagen VT1-Sakai (Yokoyama *et al.*, 2000), der ebenfalls in das Gen *yehV* integriert ist.

4.1.3. Charakterisierung des integrativen Elementes des *E. coli* O111:H⁻ Stammes 1639/77

Das Vorhandensein der drei unbekannten offenen Leserahmen 5, 6 und 7 am Übergang zwischen Bakterien- und Phagengenom von CP-1639 (Abb. 3) in der bereits von Köhler (2001) untersuchten Sequenz des *E. coli* Stammes 1639/77 legte die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Leserahmen um eine eigenständige genetische Einheit eines integrativen Elementes handeln könnte. Des Weiteren ist die nachfolgend kodierte Integrase IntA auf Aminosäureebene zu 52% identisch zu der in *E. coli* K-12 Stamm MG1655 direkt stromabwärts von *ssrA* liegenden Integrase *intA* des kryptischen Phagen CP4-57. Aus diesem Grund sollte zum einen überprüft werden, ob *intA* zu diesem integrativen Element oder zu dem Phagen CP-1639 gehört und zum anderen sollte untersucht werden, ob dieses integrative Element immer in Verbindung mit einem Bakteriophagen oder auch autonom auftritt.

Zur Klärung dieser Sachverhalte wurden verschiedene PCR-Systeme entwickelt. Die PCR Int1, die von Köhler (2001) etabliert wurde, diente zum Nachweis, dass keine Fremd-DNA stromaufwärts des Gens *b2657* integriert ist, wie es in *E. coli* K-12 Stamm MG1655 der Fall ist (Abb. 5 A). Die ebenfalls bereits von Köhler (2001) etablierten PCR-Systeme Int2, *cuo* und Int3 wurden zur Überprüfung der Abfolge der drei Leserahmen unbekannter Herkunft und *intA* stromaufwärts des Gens *b2657* genutzt (Abb. 5 B). Mittels der PCR Int4 konnte das gemeinsame Auftreten von ORF 7 und *intA* untersucht und somit die Zugehörigkeit der Integrase zu den unbekannten offenen Leserahmen ermittelt werden (Abb. 5 B). Die PCR Int5 diente der Überprüfung, ob das integrative Element in Verbindung mit einem IS629-Element auftrat, welches am Beginn der analysierten Phagensequenz von CP-1639 im *E. coli* Stamm

1639/77 inseriert vorkommt (Abb. 5 B). Unter Verwendung der PCR Int6 konnte der Übergang von *intA* und *ssrA* detektiert werden (Abb. 5 C). Diese Reaktion wurde für den Nachweis der Integration dieses Elementes ohne weitere Fremd-DNA im Bakteriengenom genutzt.

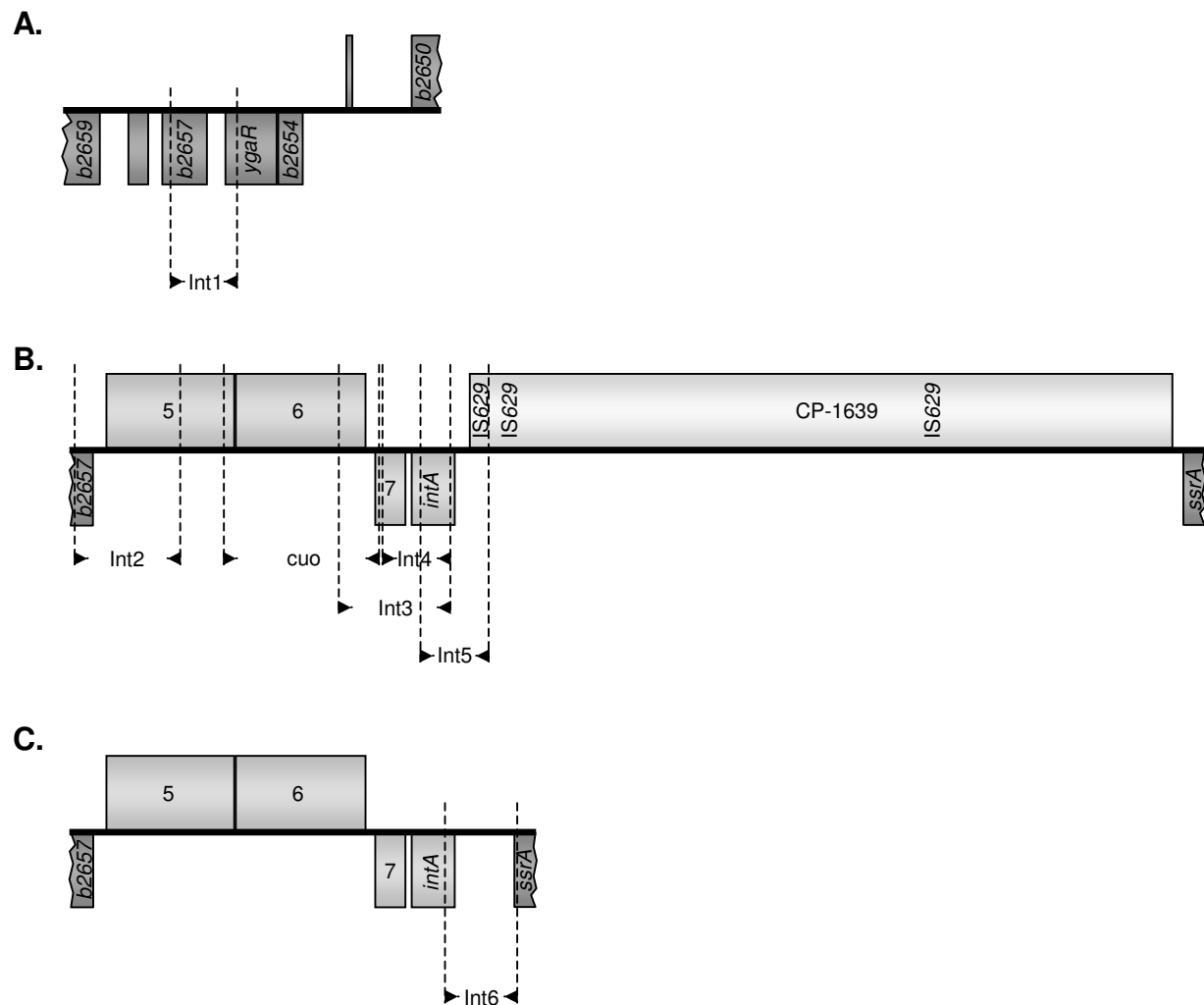


Abbildung 5: PCR-Schema zur Untersuchung, ob stromaufwärts von *b2657*, wie im *E. coli* K-12 Stamm MG1655 (NCBI-Identifikationsnummer: NC_000913), keine Fremd-DNA (A), das integrative Element in Verbindung mit einem Bakteriophagen, wie im *E. coli* Stamm 1639/77 (B) oder autonom (C) in einem *E. coli* Stamm vorhanden ist. Die Bereiche, die mittels PCR amplifiziert wurden, sind markiert.

Die PCR-Analysen wurden in 38 *E. coli* Stämmen verschiedener Serogruppen durchgeführt. Zum einen sollte untersucht werden, in welcher Form das integrative Element vorkommt und zum anderen sollte dessen Verbreitung geprüft werden. Es wurden *stx*-positive und -negative Isolate der Serogruppen O15, O26, O103, O111, O128, O145 und O157 verwendet. Die erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefasst. Die Untersuchungen einiger Stämme mittels der PCR-Systeme *Int1*, *Int2*, *cuo* und *Int3* wurden bereits von Köhler (2001) im Rahmen seiner Dissertation durchgeführt und sind in der Tabelle 9 gekennzeichnet.

Tabelle 9: PCR-Ergebnisse der Untersuchung des Vorkommens des integrativen Elementes. Zur Charakterisierung der *E. coli* Stämme ist neben dem Serotyp auch der *stx*-Genotyp angegeben.

Stamm	Serotyp	<i>stx</i> ₁	<i>stx</i> ₂	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>	<i>cuo</i>	<i>Int3</i>	<i>Int4</i>	<i>Int5</i>	<i>Int6</i>
C600	n.b.	-	-	+	-	-	-	-	-	+
1639/77	O111:H ⁻	+	-	-	+	+	+	+	+	-
4417/96	O111:H ⁻	+	-	-	+	+	+	+	+	-
5380/96	O111:H ⁻	+	-	-	+	+	+	+	+	-
6037/96	O111:H ⁻	+	+	-	+	+	+	+	+	-
5556/97	O111:H ⁻	+	-	-	+	+	+	+	+	-
6366/97	O111:H ⁻	+	+	-	+	+	+	+	+	-
4556/99	O111:H ⁻	+	-	-	+	+	+	+	-	-
RDEC-1	O15:H ⁻	-	-	-	+	+	+	+	-	+
3967/96	O26:H ⁻	+	-	-	+	+	+	+	-	+
6105/96	O26:H ⁻	+	-	-	+	+	+	+	-	+
2569/98	O26:H ⁻	+	+	-	+	+	+	+	-	+
4740/97	O26:H11	+	-	-	+	+	+	+	-	+
2636/97	O103:H ⁻	-	+	-	+	+	-	+	-	+
2791/97	O103:H ⁻	-	+	-	+	-	+	+	-	+

Stamm	Serotyp	stx ₁	stx ₂	Int1	Int2	cuo	Int3	Int4	Int5	Int6
2905/96	O103:H2	+	-	-	+	+	+	+	-	+
5577/96	O103:H2	+	-	-	-	+	+	+	-	+
5714/96	O103:H2	+	-	-	+	+	+	+	-	-
3943/97	O103:H2	+	-	-	+	+	+	+	-	+
2491/99	O103:H2	+	-	-	+	+	+	+	-	+
889	O103:H2	-	-	-	+	+	+	+	-	+
C124	O103:H2	-	-	-	+	+	+	+	-	+
E22	O103:H2	-	-	-	+	-	+	+	-	+
HBI/01	O103:H2	+	-	-	+	+	+	+	-	+
CA92-7164	O103:H7	-	-	-	-	+	+	+	-	+
1909/97	O103:H18	+	-	-	+	+	-	+	-	-
CB132	O128:H2	-	-	-	+	-	+	+	-	+
CB8260	O128:H2	-	-	-	+	+	+	+	-	+
4392/97	O145:H ⁻	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3485/99	O145:H ⁻	-	+	+	-	-	-	-	+	+
3517/99	O145:H ⁻	-	+	+	-	-	-	-	+	+
4557/99	O145:H ⁻	-	+	+	-	-	-	-	+	+
4672/99	O145:H ⁻	+	+	+	-	-	-	-	+	+
6790/96	O157:H ⁻	-	-	+	-	-	-	+	-	-
431/97	O157:H ⁻	-	-	+	-	-	-	+	-	+
659/97	O157:H ⁻	-	-	+	-	-	-	+	-	+
1249/87	O157:H7	-	+	+	-	-	-	-	-	-
19665/91	O157:H7	-	-	+	-	-	-	-	-	-
EDL933	O157:H7	+	+	+	-	-	-	-	-	-

*2,5 kb; #3,5 kb; “0,6 kb und °0,55 kb geben entsprechend abweichende Größen vom erwarteten PCR-Produkt an.; n.b. Der Serotyp wurde nicht bestimmt.

graue Schriftfarbe: Diese PCR wurde bereits von Köhler (2001) durchgeführt.

Zur Überprüfung der Sequenz des integrativen Elementes wurden die erhaltenen PCR-Produkte des O103:H2 Stammes 2905/96 analysiert. Diese Untersuchung ergab, dass der um 42 Aminosäuren verkürzte, nach dem Gen *b2657* integrierte ORF 5 zu 93%, sowie ORF 6, ORF 7 und *intA* zu 100% identisch zu der Sequenz des O111:H⁻ Stammes 1639/77 sind. Der 814 bp große DNA-Bereich des Stammes 2905/96 zwischen *intA* und *ssrA* weist Ähnlichkeiten zu OrfB eines IS3-Elementes und zu einer Integrase von *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium auf. Der sequenzierte Bereich endet mit der 3'-Region von *ssrA*. Diese Ergebnisse zeigen das Vorkommen des integrativen Elementes ohne weitere Phagen-DNA.

Alle untersuchten *E. coli* Stämme der Serogruppen O15, O26, O103, O111, O128 und ein Stamm der Serogruppe O145 ergaben in der PCR Int1 kein Produkt (Tab. 9). Folglich ist in diesen 28 *E. coli* Isolaten stromaufwärts des Gens *b2657* Fremd-DNA integriert. Bei dieser DNA handelt es sich bei 27 Stämmen um das integrative Element, zum Teil in veränderter Form, wie durch PCR und Sequenzierung nachgewiesen wurde. Für die weiteren vier Isolate der Serogruppe O145 und alle O157 Stämme wurde in der PCR Int1 ein Produkt erhalten, wie es auch bei dem Kontroll-Laborstamm C600, einem *E. coli* K-12 Derivat, der Fall war (Tab. 9). Diese 10 Stämme besitzen keine integrierte DNA zwischen den Genen *b2657* und *ygaR*.

Die sechs untersuchten *E. coli* O111:H⁻ Isolate zeigten bis auf eine Ausnahme das gleiche PCR-Muster wie der O111:H⁻ Stamm 1639/77 (Tab. 9). Somit besitzen sie das integrative Element in Verbindung des IS629-Elementes, das sich zu Beginn des Prophagen CP-1639 befindet. Aufgrund der einheitlichen, erwarteten Größe des PCR-Produktes von Int5, der negativen PCR Int6 und der gleichen Serogruppe wird angenommen, dass sie das untersuchte Element in Verbindung mit einem vermutlich ebenfalls kryptischen Phagen tragen. Für den O111:H⁻ Stamm 4556/99 wurde mit den PCR-Systemen Int5 und Int6 kein Produkt erhalten (Tab. 9). Folglich ist das integrative Element weder in der Nähe eines IS629-Elementes noch stromabwärts von *ssrA* lokalisiert. Die Ergebnisse der PCR-Analysen für den O15:H⁻ Stamm RDEC-1 und die Isolate der Serogruppe O26 ergaben eine Lokalisation des integrativen Elementes zwischen den Genen *b2657* und *ssrA* (Tab. 9). In der PCR Int2 wurde für RDEC-1, 6105/96 und 2569/98 ein um ca. 1,2 kb vergrößertes Produkt erhalten. Das war auch der Fall bei neun von 13 Stämmen der Serogruppe O103 und bei beiden O128:H2 Isolaten (Tab. 9). Die Sequenzierung der Produkte von Int2 des O26:H⁻ Stammes 6105/96 und des O103:H2 Stammes 3943/97 ergaben ein in ORF

5 inseriertes IS3-Element ähnliches DNA-Fragment. Des weiteren zeigten die Isolate der Serogruppen O103 und O128 ein heterogenes Bild in Bezug auf das integrative Element. Die O103:H2 Stämme 2905/96 und HBI/01 ergaben in den PCR-Systemen Int2, cuo, Int3 und Int4 die erwarteten Produkte (Tab. 9). Fünf O103 Isolate und der O128:H2 Stamm CB8260 besaßen das um ca. 1,2 kb vergrößerte Int2-Produkt, während cuo, Int3 und Int4 die erwarteten Produktgrößen zeigten (Tab. 9). Weiterhin waren die O103 Stämme 2791/97, E22 und das O128:H2 Isolat CB132 mit diesem Int2-Resultat negativ in der PCR cuo, sowie 2636/97 und 1909/97 negativ in der PCR Int3. Darüber hinaus zeigte der O103:H18 Stamm 1909/97 ein um ca. 1,3 kb vergrößertes Produkt in der PCR cuo (Tab. 9). Die unterschiedlichen Ergebnisse in diesen Isolaten zur Detektion des integrativen Elementes kommen wahrscheinlich durch Integration eines IS-Elementes oder Deletion von DNA-Bereichen und somit Verlust der Bindestellen für die verwendeten Oligonukleotide zustande. Für die O103 Stämme 5577/96 und CA92-7164 wurden mit Int2 keine PCR-Produkte erhalten. Allerdings ergaben die drei anderen PCR-Systeme zur Überprüfung der Anwesenheit des integrativen Elementes die erwarteten Produkte (Tab. 9). Vermutlich ist in diesen Stämmen die Oligonukleotid-Bindestelle in *b2657* oder ORF 5 deletiert. Alle Isolate der Serogruppen O103 und O128 waren negativ für Int5. Elf der 13 O103 Stämme, sowie die beiden O128 Isolate waren positiv für Int6 (Tab. 9). Diese Stämme tragen demnach das integrative Element ohne weitere Fremd-DNA stromabwärts von *ssrA*. Die Lokalisation des integrativen Elementes in den O103 Isolaten 5714/96 und 1909/97 ist unbekannt, da sie wie der O111:H⁻ Stamm 4556/99 für Int5 und Int6 negativ waren.

Das integrative Element kommt in den fünf *E. coli* O145:H⁻ Isolaten nicht vor, da keine Produkte unter Verwendung von Int2, cuo, Int3 und Int4 generiert werden konnten (Tab. 9). Mit Ausnahme des Stammes 4392/97 wurde in der PCR Int5 ein Produkt von ca. 600 bp und in der PCR Int6 ein Produkt von ca. 550 bp detektiert (Tab. 9). Diese ca. 1 kb verkürzten Amplifikate kamen wahrscheinlich durch unspezifische Bindung der Oligonukleotide im Genom dieser Bakterien zustande. Allerdings könnten sie auch die Integration von *intA* in der Nähe eines Gens mit Sequenzähnlichkeit zu einem IS629-Element und *ssrA* anzeigen. Mit dem O145:H⁻ Stamm 4392/97 konnte in keiner PCR DNA amplifiziert werden (Tab. 9). Eventuell ist in diesem Stamm Fremd-DNA, die keine Ähnlichkeit zu der untersuchten Sequenz aufweist, stromaufwärts des Gens *b2657* integriert. Die drei untersuchten O157:H⁻

Stämme waren ebenfalls negativ für Int2, *cuo* und Int3, aber positiv für Int4 (Tab. 9). Aufgrund dieser Ergebnisse besitzen sie vermutlich nicht das integrative Element, sondern nur ein Integrasegen in Assoziation mit einem ORF 7 ähnlichen Gen. In den Stämmen 431/97 und 659/97 befinden sich diese zwei Gene stromabwärts von *ssrA*. In 6790/96 ist die Lokalisation unbekannt, da weder mit Int5 noch mit Int6 ein PCR-Produkt erhalten wurde (Tab. 9). Für die drei O157:H7 Stämme wurden mit den sechs weiteren PCR-Systemen keine Produkte erhalten (Tab. 9). Sie enthalten demnach nicht das integrative Element und im Gegensatz zu *E. coli* K-12 auch kein Integrasegen stromabwärts von *ssrA*.

4.2. Charakterisierung des Proteins NleA₄₇₉₅

4.2.1. Sequenzvergleich des BP-4795 phagenkodierten Proteins NleA₄₇₉₅

Der erneute Sequenzabgleich gegen die Datenbank des NCBI ergab für das von ORF 83 des Bakteriophagen BP-4795 abgeleitete Protein auf Aminosäureebene eine Identität von 86% zu dem Protein Z6024, das am Ende des kryptischen Prophagen CP-933P im Genom des enterohämorrhagischen *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 kodiert wird (Abb. 6). Außerdem gleicht dieses potentielle BP-4795 Protein dem T3SS-Effektor NleA/Espl des *C. rodentium* Stammes DBS100 zu 78%. Die Sequenz von NleA/Espl wurde unabhängig von einer kanadischen und einer englischen Arbeitsgruppe im *C. rodentium* Stamm DBS100 analysiert (Gruenheid *et al.*, 2004; Mundy *et al.*, 2004b). Sie unterscheidet sich in zwei Aminosäuren (Abb. 6). Vermutlich sind durch spontane, evolutionär junge Mutationen des Stammes DBS100 in dem Gen *nleA/espl* verschiedene Klone entstanden, die von diesen Arbeitsgruppen untersucht wurden. Eine weitere Identität von 72% wurde zu dem Espl-like Protein ermittelt, dessen Gen am Ende eines intakten Prophagen im Genom des Kaninchen-enteropathogenen O103:H2 Stammes E22 lokalisiert ist (Abb. 6).

Aufgrund dieser hohen Sequenzähnlichkeiten wurde das potentielle von ORF 83 kodierte Protein NleA₄₇₉₅ benannt. Diese Bezeichnung steht für nicht-LEE kodierter Effektor A des Bakteriophagen BP-4795.

In der Gruppe dieser vier ähnlichen Proteine besitzt NleA₄₇₉₅ mit 459 Aminosäuren die längste Sequenz im Vergleich zu Z6024, NleA/Espl und dem Espl-like Protein, die 441, 430 bzw. 412 Aminosäuren umfassen (Abb. 6). Interessanterweise kommt

NleA ₄₇₉₅	MNIQPIVQSG	ITTQNNQ--H	HQREQIPPTQ	IPQSELPNGC	EAGFVVNIPD	DIQQHAPECG	ETTALLSLIK	DKGLLSGLDE	YIAPHLEEGS	IGKKTLDMFG	98
Z6024TI...	..S.....--	..T....S..L..	Q.....	98
NleANIH..QH.	.AEQVPVSSS	..R.D..PN.H..EV....E.....K	.L.....	L...A..T..	100
EsplNIH..QH.	.AEQVPVSSS	..R.D..PN.H..EV....E.....K	.L.....	L...A..T..	100
Espl-like	..V..N.HT.	L.PPLHL---	AHPHPA.N.	..E....P..	.T.....ET....G..RA	.L.....	A...A.....	97
NleA ₄₇₉₅	LFNVTQMALE	IPSSTVPSIS	GKYGVQMNI	KPDIHPTSGS	YFLQIFPLHD	EIGFNFKDLP	GPLKNALSNS	NISTTAVSTI	ASAATSAATS	AASTAVSTIA	198
Z6024-SG..L...N-----	-----	179
NleA-G..T.NL.....T..	S..-----	-----	-----	172
Espl-G..T.NL.....	A.....T..	S..-----	-----	-----	172
Espl-likeT--G..T.NL.....	.V.I..GA..	...QKF.--	-----	-----	-----	164
NleA ₄₇₉₅	STGTSATTST	VTTEPKDPIP	WFLTAQVVR	NHGVELPIVK	TENGWKLUGE	TPLTPDGPKA	NYTEEWVIRP	GEADFKYGAS	PLQATLGLEF	GAHFKWDLDN	298
Z6024	-.....	278
NleA	-----A..	.APT.N..M.T.	267
Espl	-----A..	.APT.N..M.T.	267
Espl-like	-----	-----QN.N.	...V.....	...I.....	.D.....E....F.L...ST	...S.....	249
NleA ₄₇₉₅	PNTKYAVLTN	AATNAVGAAG	GFAVSRLPGV	DPMLAPHIGS	MAGQALGHAV	QCYTPGLKPD	TILWWAGTTL	GLADLNKAEF	GVARFTDYPR	IWWHAREGAI	398
Z6024A..L..L.FASTS....A	.V...A...I	.YN.....A..	.A.....	E.....	378
NleAI...	..A..I....KVP.IS..V.A	.L...A....	..N.....A.F	.A.....	DKV.....	..F.....L	367
EsplI...	..A..I....KVP.IS..V.A	.L...A....	..N.....A.F	.A.....	DKV.....	..F.....L	367
Espl-likeLA..A....	.YTL.QYT.T	.A..S..V..T	.EG.....	349
NleA ₄₇₉₅	FPNKEDIARA	TGADIRAMEE	GVPVDHRHPH	PEDVVIDIES	S--PHNNPSN	YVDTVDIIRE	TRV	459			
Z6024A..EH.I..GQ...N	NGL..H....	H..IF...Q.	...	441			
NleAQ....VK....G.Q..KG	GNS..H....FE..Q.	...	430			
EsplQ....VK....G.Q..KG	GNS..H....FG..Q.	...	430			
Espl-likeI..GQ...N	NGL..H....	H..IF...Q.	...	412			

Abbildung 6: Vergleich der Aminosäuresequenz von NleA₄₇₉₅ des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97 mit Z6024 (NCBI-Identifikationsnummer: NP_287961) des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933, NleA/Espl (NCBI-Identifikationsnummern: AAR84051 bzw. AAQ75736) des *C. rodentium* Stammes DBS100 und dem Espl-like Protein (NCBI-Identifikationsnummer: AAQ07245) des *E. coli* O103:H2 Stammes E22. Identische Aminosäuren sind durch einen Punkt und fehlende Aminosäuren einer Sequenz sind durch einen Strich dargestellt.

diese Länge durch eine Verdopplung der Aminosäuresequenz TAVSTIAS, sowie ein dreimaliges Vorkommen der Aminosäuren AATS bzw. AAST zustande. Die einmalige Aminosäureabfolge TAVSTIAS ist weiterhin nur bei Z6024, einem Protein eines weiteren EHEC Stammes vorhanden. Bei NleA/Espl sind dieser Bereich und fünf weitere Aminosäuren ebenso deletiert, wie bei dem Espl-like Protein, dem darüber hinaus 20 weitere Aminosäuren fehlen (Abb. 6). Weiterhin sind vor allem die N- und C-Termini dieser Proteine sehr variabel, während die Regionen vor und nach der Aminosäurenvervielfachung von NleA₄₇₉₅ in allen Proteinen konserviert sind (Abb. 6).

4.2.2. Herstellung einer Δ escN- Deletionsmutante

Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit von NleA₄₇₉₅ zu einem T3SS Effektor, sollte überprüft werden, ob der Stx1-konvertierende Bakteriophage BP-4795 ein weiteres Protein exprimiert, welches für die Virulenz enterohämorrhagischer *E. coli* von Bedeutung sein könnte.

Für diese Untersuchung wurde eine Mutante mit inaktiviertem T3SS, durch Deletion des Gens *escN*, hergestellt. Das Gen *escN* kodiert für eine ATPase, die für die energieabhängige Proteinsekretion des T3SS essentiell ist (Jarvis *et al.*, 1995). Die Deletion des Gens erfolgte unter Verwendung der „One-step inactivation“-Methode von Datsenko und Wanner (2000). Dazu wurde mit den Oligonukleotiden d-escN-for und d-escN-rev ein PCR-Produkt generiert, das eine von FRT-Sites flankierte Antibiotikaresistenz, sowie an dem jeweiligen Ende 42 homologe Basenpaare zu dem Bereich 65-107 bp stromabwärts des Startcodons von *escN* bzw. zu der Region 17-59 bp stromaufwärts des Stopcodons von *escN* umfasste. Dieses PCR-Produkt wurde in einen zuvor mit dem λ -Red Rekombinasesystem-tragenden Plasmid pKD46 transformierten *E. coli* O84:H4 Stamm 4795/97 eingebracht. Dabei vermittelte das Plasmid pKD46 die Rekombination der homologen Sequenzen des PCR-Produktes und des Gens *escN*. Die zur Selektion verwendete Antibiotikaresistenz wurde nach erfolgreicher Integration des PCR-Produktes in das Bakteriengenom mit Hilfe des FLP-Rekombinase-tragenden Plasmides pCP20 entfernt. Die FLP-Rekombinase vermittelt die Rekombination der FRT-Sites und dieses Ereignis führt zum Verlust der flankierten Antibiotikaresistenz. Aufgrund der hohen Spezifität der Rekombination wurde die Deletion von *escN* mittels PCR und Sequenzierung unter Verwendung der Oligonukleotide Z5119-for und Z5119-rev mit Bindestellen 40-62 bp bzw. 330-352 bp

stromabwärts und -aufwärts des Gens überprüft. Diese Kontrolluntersuchungen bestätigten die Deletion des Gens *escN* im Genom verschiedener generierter Klone der Deletionsmutante 4795 Δ *escN* (Abb.7). Mittels einer darüber hinaus durchgeführten PCR wurde das unveränderte Gen *nleA*₄₇₉₅ bei Klonen der Mutante 4595 Δ *escN* nachgewiesen (Abb. 7).

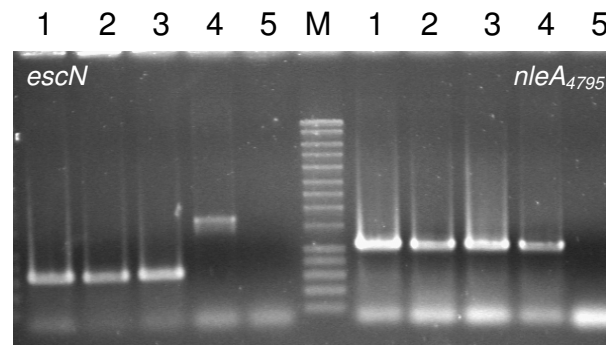


Abbildung 7: PCR zum Nachweis der Deletion des Gens *escN* (links) und des unveränderten Gens *nleA*₄₇₉₅ (rechts) im Genom der Deletionsmutante 4595 Δ *escN*. Aufgetragen wurden drei verschiedene hergestellte 4595 Δ *escN* Mutanten (Spur 1-3), der Stamm 4795/97 (Spur 4) und NaCl als Negativkontrolle (Spur 5). Als Größenstandard M wurde der GeneRuler™ 1kb DNA Ladder der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) verwendet.

4.2.3. Typ III Sekretionssystem-abhängiger Transport von NleA₄₇₉₅

Zur Untersuchung der Funktionalität und der T3SS-abhängigen Sekretion von NleA₄₇₉₅ wurde das 1380 bp umfassende Gen *nleA*₄₇₉₅, sowie 364 bp des Bereiches stromaufwärts des Gens, der die Promotorregion von *nleA*₄₇₉₅ beinhaltet, mittels PCR amplifiziert. Unter Verwendung der Oligonukleotide ORF83-for2 und ORF83-HA-rev wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *EcoRI* bzw. *XbaI* und darüber hinaus C-terminal die Sequenz von neun Codons des Hämagglutinin (HA)-Epitopes des humanen Influenzavirus angefügt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Plasmiden pBluescriptIIKS+ und pWSK29 ligiert, die mit hoher bzw. geringer Kopienzahl repliziert werden. Im Anschluss wurde der Ligationsansatz in den *E. coli* Laborstamm C600 transformiert. Die Korrektheit des C-terminal HA-markierten Gens *nleA*₄₇₉₅ wurde mittels Sequenzanalyse überprüft. Ein Großteil der untersuchten

	1									100
NleA ₄₇₉₅ -HA	MNIQPIVQSG	ITTQNNQHHQ	REQIPPTQIP	QSELPNGCEA	GFVVNIPDDI	QQHAPECGET	TALLSLIKDK	GLLSGLDEYI	APHLEEGSIG	KKTLDMFGLF
LB4
LB5	-TFNRSYNPE	SPR.....
LB8
LB9
LB14	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----RRIHR
LB15
LW1
LW3
LW21
LW24S.....
	101									200
NleA ₄₇₉₅ -HA	NVTQMALEIP	SSTVPSISGK	YGVQMNIVKP	DIHPTSGSYF	LQIFPLHDEI	GFNFKDLPGP	LKNALSNSNI	STTAVSTIAS	AATSAATSAA	STAVSTIAST
LB4	..A.....A.....
LB5
LB8P.....
LB9
LB14D.....
LB15
LW1
LW3
LW21A.....
LW24A.....
	201									300
NleA ₄₇₉₅ -HA	GTSATTSTVT	TEPKDPIPWF	GLTAQVVRNH	GVELPIVKTE	NGWKLVGETP	LTPDGPKANY	TEEWVIRPGE	ADFKYGASPL	QATLGLEFGA	HFKWDLNPN
LB4	.A.....
LB5
LB8
LB9
LB14R.....
LB15
LW1K.....
LW3
LW21R.....
LW24R.....V-----

	301									400
NleA ₄₇₉₅ -HA	TKYAVLTNAA	TNAVGAAGGF	AVSRLPGVDP	MLAPHIGSMA	GQALGHAVQC	YTPGLKPDTI	LWWAGTTLGL	ADLNKAIEFGV	ARFTDYPRIW	WHAREGAIFP
LB4
LB5
LB8	S.....
LB9
LB14
LB15
LW1
LW3	F.....
LW21Y..
LW24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	401									
NleA ₄₇₉₅ -HA	NKEDIARATG	ADIRAMEEGV	PVDHRHPHPE	DVVIDIESSP	HNNPSNYVDT	VDIIRETRVY	PYDVDPDYA			468
LB4LI			470
LB5C.LI			469
LB8LI			470
LB9RLI			470
LB14V.....			383
LB15RL I			471
LW1			468
LW3			468
LW21			468
LW24	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----			295

Abbildung 8: Vergleich der Aminosäuresequenz von NleA₄₇₉₅ des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97 und der NleA₄₇₉₅-HA-Plasmid-tragenden Transformanten des *E. coli* Laborstammes C600. Identische Aminosäuren sind durch einen Punkt und fehlende Aminosäuren einer Sequenz sind durch einen Strich dargestellt. Grau unterlegt sind die Sequenzen der weiterbearbeiteten Plasmide.

Sequenzen wies bis zu sechs Mutationen auf, bei denen es sich um eine Substitution, Insertion oder Deletion einzelner Basen handelte. Diese Mutationen hatten in fast allen Fällen Einfluss auf Aminosäureebene, was sich in bis zu drei veränderten Aminosäuren, dem Verlust des N-Terminus, dem Einbau eines vorzeitigen Stopcodons oder der Insertion weiterer zwei bis drei Aminosäuren zwischen HA-tag und Stopcodon auswirkte (Abb. 8). Von Klonen, mit unveränderter *NleA*₄₇₉₅-Aminosäuresequenz, wurden die Plasmide isoliert, in den *E. coli* O84:H4 Wildtyp-Stamm 4795/97, sowie den T3SS-defekten Stamm 4795 Δ *escN* transformiert und erneut mittels Sequenzanalyse überprüft. Diese ergab für alle Vektoren unveränderte *nleA*₄₇₉₅-HA-Bereiche. Für weitere Untersuchungen wurden die Klone pLB15-1, des Plasmides pBluescriptIIKS+ und pLW1-1, des Plasmides pWSK29 beider *E. coli* Stämme verwendet. Der Klon pLB15-1 trägt keine Mutationen in der Sequenz des Gens *nleA*₄₇₉₅. Er besitzt allerdings eine Substitution im Bereich stromaufwärts des Gens und vier zusätzliche Nukleotide nach dem angefügten HA-Epitop, was zur Insertion der Aminosäuren Arginin, Leucin und Isoleucin zwischen HA-tag und Stopcodon führte (Abb. 8). Der Klon pLW1-1 weist auf Nukleotidebene an zwei Positionen substituierte Basen auf, die keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz von *NleA*₄₇₉₅ besitzen (Abb. 8). Er besitzt ebenfalls einen Basenaustausch im Bereich stromaufwärts des Gens. Weiterhin wurden die Plasmide pBluescriptIIKS+ und pWSK29 ohne inserierte Fremd-DNA in die Stämme 4795/97 und 4795 Δ *escN* transformiert. Diese Stämme dienten als Negativkontrollen.

Zur Induktion des T3SS wurden die generierten *E. coli* O84:H4 Stämme in M9-Minimalmedium kultiviert. Definierte Volumen der, auf eine OD₆₀₀ von 0,8 eingestellten Bakterienkulturen wurden entnommen. Die Western Blot Untersuchung der präparierten Gesamtzelllysate, sowie der mittels TCA-Fällung konzentrierten, sekretierten Proteine der Zellüberstände erfolgte unter Verwendung des NuPAGE® Elektrophorese-Systems der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) mit einem murinen primären Antikörper gegen HA (Abb. 9).

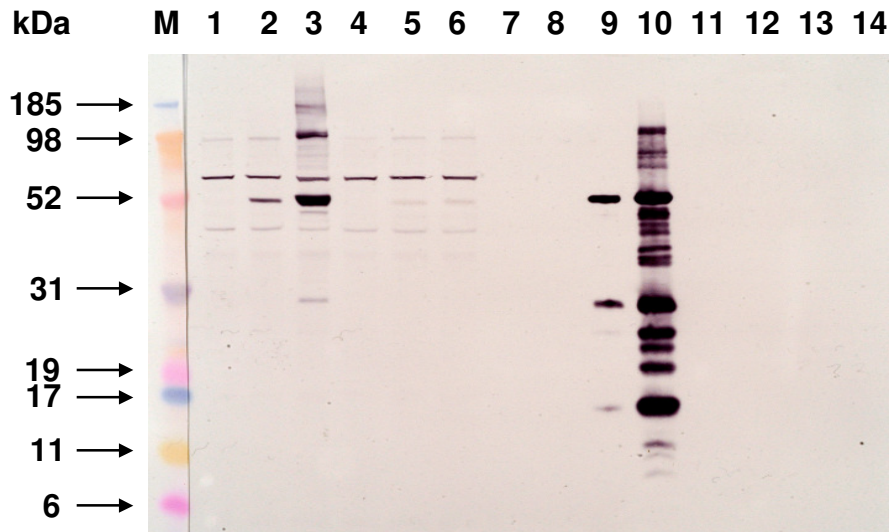


Abbildung 9: Western Blot der bakteriellen Zelllysate (Spuren 1-6) und Zellüberstände (Spuren 8-10 und 12-14). Aufgetragen wurden der Kontrollstamm 4795/pB (Spuren 1 und 8), die *nleA*₄₇₉₅-HA-tragenden Wildtyp-Stämme 4795/pLW1-1 (Spuren 2 und 9) und 4795/pLB15-1 (Spuren 3 und 10), der Kontrollstamm 4795Δ*escN*/pW (Spuren 4 und 12), sowie die *nleA*₄₇₉₅-HA-tragenden Deletionsmutanten 4795Δ*escN*/pLW1-1 (Spuren 5 und 13) und 4795Δ*escN*/pLB15-1 (Spuren 6 und 14). Die Spuren 7 und 11 wurden nicht beladen. Als Größenstandard diente der MultiMark® Multi-Colored Standard (Invitrogen GmbH, Karlsruhe).

Für das HA-markierte Protein NleA₄₇₉₅ wurde aufgrund der Sequenz ein Molekulargewicht von 50,34 kDa berechnet. Eine Bande bei ca. 50 kDa ist sowohl in den Zelllysaten der rekombinanten Wildtyp-Stämme 4795/pLW1-1 und 4795/pLB15-1, als auch in den Deletionsmutanten 4795Δ*escN*/pLW1-1 und 4795Δ*escN*/pLB15-1, die HA-markiertes NleA₄₇₉₅ exprimierten, sichtbar (Abb. 9). Dagegen ist bei den Kontrollstämmen 4795/pB und 4795Δ*escN*/pW, mit einem Plasmid ohne Insert, keine Bande auf dieser Höhe erkennbar. Somit handelt es sich bei NleA₄₇₉₅ des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97 um ein funktionelles Protein. Die Bande bei ca. 50 kDa ist stärker bei dem Stamm 4795/pLB15-1, der NleA₄₇₉₅ von dem Vektor pBluescriptIIKS+ mit hoher Kopienzahl exprimiert, als bei dem pWSK29-tragenden Stamm 4795/pLW1-1, mit geringer Kopienzahl. Weiterhin ist auffällig, dass in den rekombinanten Deletionsmutanten 4795Δ*escN*/pLW1-1 und 4795Δ*escN*/pLB15-1 NleA₄₇₉₅-HA in we-

sentlich geringerem Maße exprimiert wurde, im Vergleich zu den Wildtyp-Stämmen 4795/pLW1-1 und 4795/pLB15-1 mit intaktem T3SS (Abb. 9).

In den Zellüberständen ist nur bei den rekombinanten Wildtyp-Stämmen 4795/pLW1-1 und 4795/pLB15-1 mit intaktem T3SS ein Protein bei ca. 50 kDa detektierbar (Abb. 9). Im Gegensatz dazu ist weder in den Kulturüberständen der Deletionsmutanten 4795 Δ escN/pLW1-1 und 4795 Δ escN/pLB15-1 mit defektem T3SS, noch in den Kontrollstämmen 4795/pB und 4795 Δ escN/pW ein Protein sichtbar. Dies weist darauf hin, dass NleA₄₇₉₅ ein funktionelles T3SS für seine Sekretion in den Kulturüberstand benötigt.

4.2.4. Verringerte NleA₄₇₉₅-Expression bei inaktivem Typ III Sekretionssystem

Für die Überprüfung, dass die verringerte Expression von NleA₄₇₉₅-HA in den plasmidtragenden Deletionsmutanten 4795 Δ escN/pLW1-1 und 4795 Δ escN/pLB15-1 keinen artifiziellen Effekt darstellt, wurde eine Fusion von *nleA*₄₇₉₅ mit dem HA-Epitop im Genom generiert. Hierfür wurde die von Uzzau *et al.* (2001) modifizierte „One-step inactivation“-Methode nach Datsenko und Wanner (2000) verwendet. Als Matrizen-DNA für das PCR-Produkt dienten anstelle der Vektoren pKD3 bzw. pKD4 die Plasmide pSU314 bzw. pSU315, die zusätzlich zu der FRT-Site flankierten Antibiotikaresistenz, die Sequenz des HA-Epitopes mit abschließendem Stopcodon direkt stromaufwärts dieses Elementes tragen. Die PCR-Amplifikation der benötigten Plasmidregion erfolgte mit den Oligonukleotiden Ch-83HA-for und Ch-83HA-rev. Zusätzlich wurden mit Hilfe dieser Oligonukleotide jeweils 45 homologe Basenpaare zu dem C-terminalen Ende von *nleA*₄₇₉₅ und zu dem direkt stromabwärts anschließenden Bereich des Gens eingeführt. Die Insertion des HA-Epitopes und der FRT-Site flankierten Antibiotikaresistenz erfolgte durch Rekombination im Leseraster am Ende des Gens *nleA*₄₇₉₅ in den Plasmid pKD46 tragenden *E. coli* O84:H4 Stämmen 4795/97 und 4795 Δ escN. Die zur Selektion verwendete Antibiotikaresistenz wurde im Anschluss wiederum unter Verwendung des Plasmides pCP20 entfernt. Die Korrektheit der chromosomalen HA-Fusion von *nleA*₄₇₉₅ wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide non83(HA)-for2 und non83-rev mit Bindestellen 107-129 bp bzw. 60-80 bp stromabwärts und -aufwärts des Gens untersucht. Aufgrund der homologen Sequenzen der bereits vorhandenen FRT-Sites im Genom des Ausgangsstammes 4795 Δ escN erfolgte die Überprüfung der unveränderten Deletion des Gens *escN* mit-

tels PCR mit den Oligonukleotiden Z5119-for und Z5119-rev. Die anschließende Sequenzanalyse der generierten Mutanten 4795/HACH14-5 und 4795 Δ escN/HACH2-11 ergab jeweils einen unverändertes *nleA*₄₇₉₅ Gen mit fusioniertem HA-Epitop im korrekten Leseraster.

Diese Mutanten, sowie die Kontrollstämme 4795/97 und 4795 Δ escN, wurden unter T3SS-induzierenden Bedingungen in M9-Minimalmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 kultiviert und Gesamtzelllysate gleicher Konzentration präpariert. Die Untersuchung der Lysate erfolgte mittels Western Blot mit einem murinen primären Antikörper gegen HA unter Verwendung des „Amersham ECLTM Western Blotting Systems“ (GE Healthcare, Freiburg) zur Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes (Abb. 10).

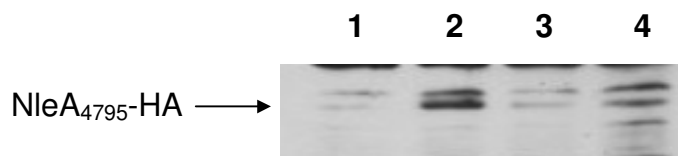


Abbildung 10: Western Blot der bakteriellen Zelllysate verschiedener *E. coli* O84:H4 Stämme. Aufgetragen wurden der Kontrollstamm 4795/97 (Spur 1), der chromosomal *nleA*₄₇₉₅-HA-fusionierte Wildtyp-Stamm 4795/HACH14-5 (Spur 2), der Kontrollstamm 4795 Δ escN (Spur 3), sowie die chromosomal *nleA*₄₇₉₅-HA-fusionierte Deletionsmutante 4795 Δ escN/HACH2-11 (Spur 4).

Nach der chromosomalen HA-Markierung von *nleA*₄₇₉₅ ist ebenfalls eine schwächere Bande bei der Deletionsmutante 4795 Δ escN/HACH2-11, im Vergleich zu dem Wildtyp-Stamm 4795/HACH14-5, nachweisbar. Dies bestätigt die Ergebnisse der Untersuchung mit plasmidtragenden Mutanten, dass NleA₄₇₉₅, nach der Deletion des ATPase-Gens *escN* des T3SS, schwächer exprimiert wird.

Weiterhin ist auch jeweils eine schwache Bande in den Kontrollstämmen 4795/97 und 4795 Δ escN auf gleicher Höhe mit NleA₄₇₉₅-HA detektierbar, bei der es sich wahrscheinlich um ein Protein mit HA-ähnlichem Epitop handelt. Der verwendete primäre Maus Anti-HA (12CA5) Antikörper bindet nicht nur an NleA₄₇₉₅-HA, sondern ebenfalls unspezifisch an Proteine mit ähnlichem Epitop, was an einem einheitlichen Bandenmuster, abgesehen von NleA₄₇₉₅-HA, bei allen untersuchten Stämme sichtbar ist (Abb. 9 und 10). Aufgrund der höheren Sensitivität des „Amersham ECLTM Western Blotting Systems“ (GE Healthcare GmbH, Freiburg), im Vergleich zur Detektion mittels Chlornaphtol-Lösung, ist diese Bande bei der Untersuchung der

chromosomal mutierten Stämme sichtbar, während sie bei der Western Blot-Analyse der plasmidtragenden *E. coli* O84:H4 Stämme nicht detektiert wurde (Abb. 9 und 10).

4.2.5. Translokation von NleA₄₇₉₅ in eukaryotische Zellen

Der Transport von NleA₄₇₉₅ in eukaryotische Wirtszellen sollte mittels Immunfluoreszenz untersucht werden. Diese Versuche wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Hensel von Dr. Volker Kuhle am Institut für klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg durchgeführt.

Zur Überprüfung der Lokalisation von NleA₄₇₉₅ in einer eukaryotischen Wirtszelle, wurde eine HeLa-Zelllinie mit den *E. coli* O84:H4 Stämmen 4795/pLW1-1 bzw. 4795/pLB15-1, sowie den Deletionsmutanten 4795 Δ escN/pLW1-1 bzw. 4795 Δ escN/pLB15-1 infiziert, die HA-markiertes NleA₄₇₉₅ auf einem Plasmid mit geringer bzw. hoher Kopienzahl exprimierten. Als Negativkontrolle diente der pBluescriptIIKS+-tragende Wildtyp-Stamm 4795/pB. Sechs Stunden nach der Infektion wurde NleA₄₇₉₅-HA, sowie verschiedene Kompartimente der Wirtszellen angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (Abb. 11).

Die Zellkerne der HeLa-Zellen und die Bakterien wurden mit DAPI (Blau) angefärbt. Die Detektion von NleA₄₇₉₅-HA (Rot) erfolgte mit Hilfe eines primären Antikörpers gegen HA und eines sekundären Cyanine-3-konjugierten Antikörpers. Das Trans-Golgi Netzwerk (Grün) wurde unter Verwendung eines primären Antikörpers gegen humanes Golgin-97 und eines sekundären Cyanine2-konjugierten Antikörpers angefärbt (Abb. 11).

Ein Signal für transloziertes NleA₄₇₉₅-HA konnte nur in den mit *E. coli* 4795/pLB15-1 bzw. 4795/pLW1-1 infizierten HeLa-Zellen detektiert werden. Dagegen konnte kein NleA₄₇₉₅-HA in eukaryotischen Zellen nachgewiesen werden, die mit den Deletionsmutanten 4795 Δ escN/pLB15-1 bzw. 4795 Δ escN/pLW1-1 oder dem *E. coli* O84:H4 Stamm 4795/pB infiziert waren. Bei dem NleA₄₇₉₅-HA-Signal einer 4795 Δ escN/pLW1-1 infizierten HeLa-Zelle handelt es sich vermutlich um ein Artefakt. (Abb. 11). Anhand dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass die Translokation von NleA₄₇₉₅ in eukaryotische Wirtszellen mit Hilfe des T3SS erfolgt. Des weiteren deuten die Überlagerungen der mikroskopischen Aufnahmen auf eine Lokalisation von NleA₄₇₉₅ innerhalb des Trans-Golgi Netzwerkes hin (Abb. 11).

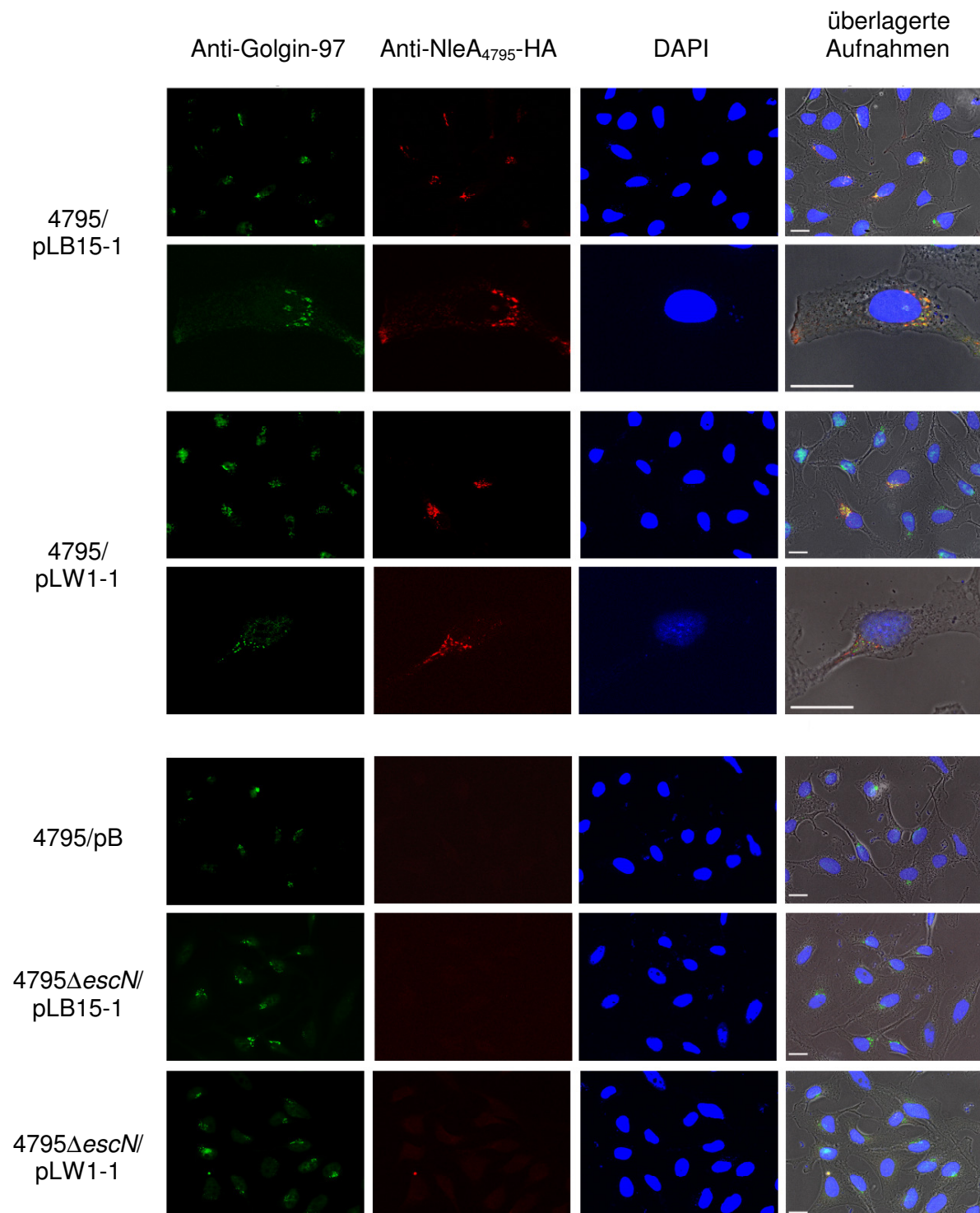


Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopie infizierter HeLa-Zellen mit den rekombinanten *E. coli* Stämmen 4795/pLB15-1, 4795/pLW1-1, 4795ΔescN/pLB15-1 bzw. 4795ΔescN/pLW1-1. Der Stamm 4795/pB diente als Negativkontrolle. Das angefärbte Trans-Golgi Netzwerk ist grün, NleA₄₇₉₅-HA rot und die Zellkerne der HeLa-Zellen, sowie die Bakterien sind blau dargestellt. Diese wurden mit einer Phasenkontrastaufnahme überlagert. Die Balken entsprechen einer Länge von 10 µm.

4.3. Verbreitung und genetische Charakterisierung der *nleA*-Familie

4.3.1. Verbreitung des Gens *nleA* innerhalb pathogener *E. coli*

Die Verbreitung des Gens *nleA* wurde innerhalb verschiedener Serogruppen von STEC und EPEC untersucht. Insgesamt wurden 170 *E. coli* Isolate überprüft, deren relevante Geno- und Serotypen in der Tabelle 12 in Kapitel 4.3.3. beschrieben sind. Ein Großteil der Stämme wurde der Stammsammlung von Prof. Dr. Herbert Schmidt (Fachgebiet Lebensmittelmikrobiologie, Institut für Lebensmittelwissenschaft und Biotechnologie, Universität Hohenheim, Stuttgart) entnommen und neun O84 Isolate wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Helmut Tschäpe (Robert Koch Institut, Wernigerode) zur Verfügung gestellt. Die untersuchten Stämme beinhalteten 135 Isolate aus humanem Fäzes, 33 Stämme aus den Fäzes verschiedener Tierarten und zwei Lebensmittelisolate der Serogruppen O15, O26, O49, O84, O103, O111, O118, O125, O127, O128, O145, O156 und O157 (Tab. 12).

Alle Stämme wurden mit Hilfe einer PCR unter Verwendung der Oligonukleotide V83-for2 und V83-rev2 auf das Vorkommen des Gens *nleA* untersucht. Diese Oligonukleotide binden in konservierten Bereichen von *nleA* ca. 150 bis 170 bp stromabwärts des Startcodons und ca. 130 bis 150 bp stromaufwärts des Stoppcodons. Isolate, bei denen kein Produkt amplifiziert werden konnte, wurden nochmals mit Hilfe der Oligonukleotide V83-for2 und V83-rev3 überprüft. V83-rev3 bindet ca. 75 bis 100 bp stromaufwärts des Stoppcodons. Diese PCR führte zur Detektion von *nleA* in dem O145:H28 Stamm DG264/4, der zuvor als negativ eingestuft wurde. Insgesamt wurde das Gen *nleA* in 149 der untersuchten 170 Stämme nachgewiesen (Tab. 10). So konnte das Gen *nleA* in allen überprüften Isolaten der Serogruppen O26, O111 und O157, sowie in 21 von 22 *E. coli* O103 Stämmen und in 17 von 20 O145 Isolaten nachgewiesen werden. Diese Serogruppen treten vor allem in Zusammenhang mit humanen EHEC-Infektionen auf, die zumeist mit schwerwiegenden Krankheitssymptomen assoziiert sind. Dagegen wiesen meist nur zwei Drittel der Vertreter der anderen Serogruppen, die nur eine untergeordnete Rolle in der Humanmedizin spielen, *nleA* in ihrem Genom auf (Tab. 10). So wurde *nleA* in allen 48 untersuchten HUS-Isolaten und in 40 der 48 isolierten Stämme von Patienten mit Diarrhöe nachgewiesen.

Tabelle 10: Verbreitung des Gens *nleA* innerhalb ausgewählter Serogruppen von STEC und EPEC.

Serogruppe	Anzahl	<i>nleA</i> -positiv	<i>nleA</i> -negativ
O15	1	1	0
O26	18	18	0
O49	14	10	4
O84	16	16	0
O103	22	21	1
O111	20	20	0
O118	1	1	0
O125	1	1	0
O127	1	0	1
O128	19	12	7
O145	20	17	3
O156	17	12	5
O157	20	20	0
gesamt:	170	149	21

Mit Ausnahme des *E. coli* O103:H2 Stammes S21195 und des O111:H⁻ Stammes 1187/00 konnte bei diesen 149 *nleA*-positiven Isolaten ebenfalls das Gen *eae* nachgewiesen werden (Tab. 12). Dieses Gen gilt als Marker für die Anwesenheit des LEE und somit des T3SS, das für die Sekretion von NleA notwendig ist. Zur Klärung der Frage, ob diese beiden Stämme die Pathogenitätsinsel des LEE tragen, wurden weitere PCR-Analysen durchgeführt. Aufgrund der Lokalisation von *eae* im Operon LEE4 wurden die Gene *ler* des LEE1, *escJ* des LEE2, *escV* und *escN* des LEE3, sowie *espA* des LEE5 ausgewählt. Als Positivkontrollen dienten der *E. coli* O103:H2 Stamm HBI/01 und der *E. coli* O111:H⁻ Stamm 2516/00. Auch mit Hilfe dieser PCR-Systeme konnten keine Produkte amplifiziert werden, im Gegensatz zu den beiden Kontrollstämmen der gleichen Serotypen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die *E. coli* Stämme S21195 und 1187/00 keinen LEE besitzen und wahrscheinlich nicht zur Sekretion von NleA in der Lage sind. Allerdings wurde diese Eigenschaft nicht experimentell überprüft.

4.3.2. Restriktionsanalyse von *nleA* zur Identifikation verschiedener Varianten

Die Sequenzierung von *nleA* in verschiedenen Bakterien führte zur Identifizierung der Varianten *nleA/espl*, *z6024*, *nleA₄₇₉₅* und *espl-like* (Kapitel 4.2.1.). Des weiteren variierten die amplifizierten Fragmente der PCR zum Nachweis des Gens *nleA* leicht in ihrer Länge. Aus diesem Grund sollten die erhaltenen PCR-Produkte mit Hilfe von Restriktionsanalysen näher charakterisiert werden.

Jedes *nleA*-Fragment wurde zum einen mit dem Restriktionsenzym *BseNI* und zum anderen mit *PstI* über Nacht bei 65°C bzw. 37°C geschnitten. Für die vier bereits bekannten *nleA*-Varianten wurden die in Tabelle 11 aufgeführten Fragmentgrößen, nach DNA-Restriktion unter Verwendung dieser Endonukleasen, berechnet. Somit sollte mit Hilfe von *BseNI* und *PstI* eine eindeutige Unterscheidung der Varianten möglich sein.

Tabelle 11: Berechnete Fragmentgrößen der Restriktionsanalyse mit *BseNI* und *PstI*

Name <i>nleA</i> -Variante	Fragmentlänge PCR-Produkt	Fragmentlänge nach <i>BseNI</i> -Restriktionsspaltung	Fragmentlänge nach <i>PstI</i> -Restriktionsspaltung
<i>nleA₄₇₉₅</i>	1103 bp	545 bp, 649 bp	57 bp, 368 bp, 678 bp
<i>z6024</i>	1043 bp	146 bp, 394 bp, 503 bp	365 bp, 678 bp
<i>espl-like</i>	959 bp	959 bp	306 bp, 653 bp
<i>nleA</i>	1004 bp	177 bp, 392 bp, 435 bp	1004 bp

Neben den erwarteten Banden von *nleA₄₇₉₅*, *z6024* und *espl-like* wurden weitere elf Restriktionsmuster erhalten (Abb. 12). Dagegen konnte *nleA* von *C. rodentium* nicht detektiert werden.

Die meisten Varianten wiesen eine bis zwei Schnittstellen für *BseNI* und *PstI* auf. Weiterhin wurden die PCR-Produkte oft nicht vollständig geschnitten, so dass bei etwa 1000 bis 1100 Basenpaaren noch eine schwache Bande des zuvor amplifizierten Fragmentes sichtbar ist (Abb. 12). Darüber hinaus zeigen einige Varianten ein gleiches Bandenmuster nach der Restriktionsspaltung mit einem Enzym, während dieses für das zweite Enzym unterschiedlich ist. So werden die etwa 1040 bp langen PCR-Produkte von Vertretern der in Spur 4 und Spur 5 aufgetragenen Varianten von *BseNI* nicht geschnitten. Dagegen schneidet *PstI* einmal das *nleA*-Fragment

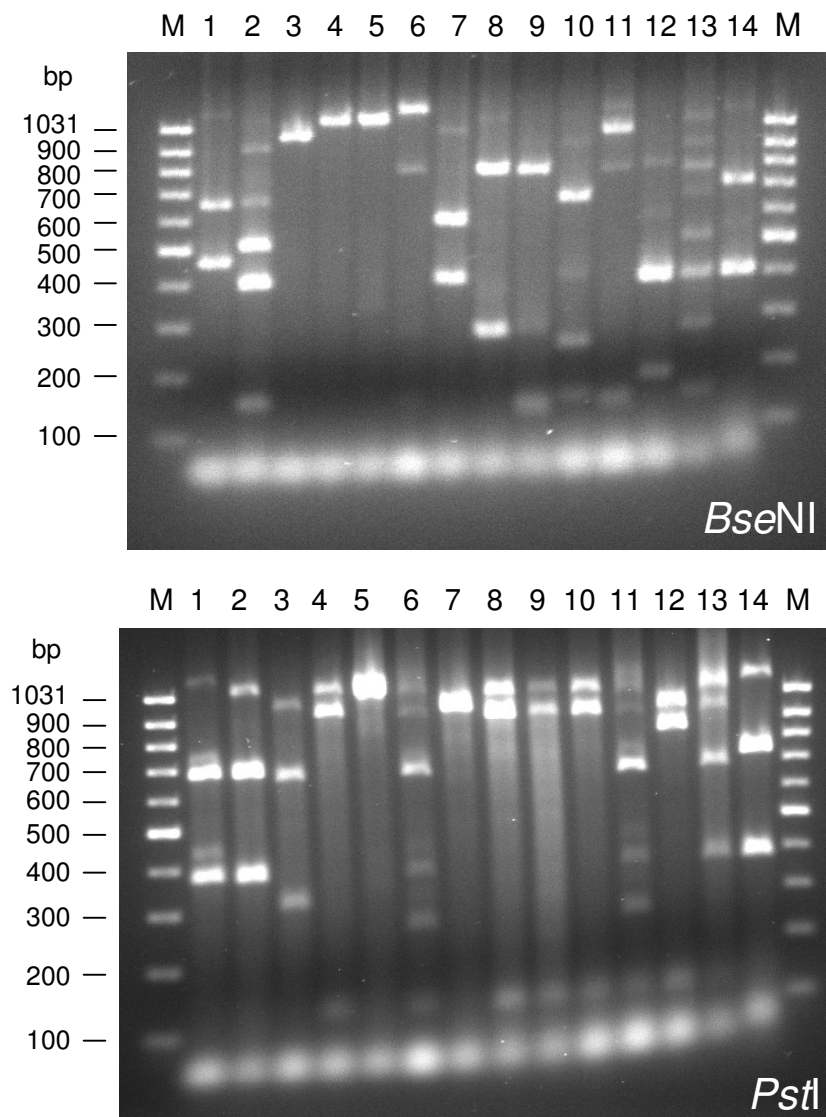


Abbildung 12: Restriktionsmuster verschiedener *nleA*-Varianten unter Verwendung der Enzyme *BseNI* und *PstI*. Aufgetragen wurden die *E. coli* Stämme in Spur 1: 4795/97 (*nleA*₄₇₉₅); Spur 2: EDL933 (*z6024*); Spur 3: E22 (*espl-like*); Spur 4: 5721/96 (*nleA8-1*); Spur 5: 0917/99 (*nleA5*); Spur 6: PT272 (*nleA6-1*); Spur 7: CB6116 (*nleA7*); Spur 8: 3439/00 (*nleA8-1*); Spur 9: CF11201 (*nleA8-2*); Spur 10: CB6389 (*nleA9*); Spur 11: CB8745 (*nleA6-2*); Spur 12: CB7690 (*nleA10*); Spur 13: 1247/95 (*z6024*, *nleA8-1*); Spur 14: DG264/4 (*nleA11*). Als Größenstandard (M) diente der GeneRuler™ 100bp DNA Ladder der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot).

vom Typ des in Spur 4 aufgetragenen Stammes, was in einem unterschiedlichen Bandenmuster dieser zwei Varianten resultiert (Abb. 12). Während für alle weiteren erhaltenen Restriktionsmuster des Enzyms *BseNI* Unterschiede erkennbar waren, zeigten Vertreter verschiedener *nleA*-Varianten ein einheitliches Bild für *PstI*-ge-

schnittene PCR-Produkte. Dies galt zum einen für Vertreter der in den Spuren 4, 8, 9 und 10 sichtbaren Fragmente nach der DNA-Restriktion unter Verwendung von *Pst*I und zum anderen für die in den Spuren 6 und 11 sichtbaren Varianten (Abb. 12). Des weiteren zeigten fast alle untersuchten Isolate der Serogruppe O26 ein Restriktionsmuster, wie in Spur 13 dargestellt. Diese erhaltenen Banden deuteten auf die Anwesenheit von zwei unterschiedlichen *nleA*-Varianten im Genom der entsprechenden *E. coli* O26 Stämme hin, da sie im Vergleich mit den anderen Restriktionsmustern wie ein Gemisch der in Spuren 2 und 8 erkennbaren Banden aussehen (Abb.12).

4.3.3. DNA-Sequenzanalyse von *nleA*-Varianten pathogener *E. coli* Stämme

Zur Überprüfung und Charakterisierung der unbekannten Varianten des Gens *nleA* sollte für alle erhaltenen Bandenmuster von jedem Serotyp das PCR-Produkt eines Stammes sequenziert werden.

Der komplette offene Leserahmen der *nleA*-Variante, sowie jeweils ca. 100 bp des flankierenden Bereiches wurden unter Verwendung der Oligonukleotide VarA-for und VarA-rev amplifiziert. Für Stämme, bei denen mit Hilfe dieser Oligonukleotide kein Produkt hergestellt werden konnte, wurde anstatt VarA-rev das Oligonukleotid VarA-rev2 genutzt. Dieses bindet direkt stromaufwärts des Stoppcodons. Eindeutige PCR-Produkte wurden enzymatisch aufgereinigt und vollständig sequenziert. Wurden Doppelbanden bei einer PCR erhalten, erfolgte die Aufreinigung des entsprechenden DNA-Fragmentes unter Verwendung des „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma QIAGEN GmbH (Hilden). Aufgrund der Ergebnisse der Restriktionsspaltung (Kapitel 4.3.2) und der Southern-Hybridisierung (Kapitel 4.3.4.) wurde bei einigen Stämmen die Amplifikation von zwei unterschiedlichen *nleA*-Fragmenten gleicher Länge vermutet, die in der an die PCR anschließenden Agarose-Gelelektrophorese nur als einzelne Bande sichtbar waren. Für diese Stämme wurde eine PCR mit Hilfe des „TOPOTM TA Cloning[®]“ Kits der Firma Invitrogen GmbH (Karlsruhe) durchgeführt. Das erhaltene Produkt wurde wiederum unter Verwendung dieses Kits mit dem pCR[®]2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen GmbH) ligiert und im Anschluss in einen *E. coli* Laborstamm transformiert. Einzelkolonien ausgewählter Transformanten dienten als Matrizen-DNA für eine erneute PCR, deren Produkt enzymatisch aufgereinigt und sequenziert wurde.

Neben den drei bekannten Varianten *nleA*₄₇₉₅, *z6024* und *espl-like* konnten elf weitere *nleA*-Varianten identifiziert werden (Abb. 13, Tab. 12). Als Varianten wurden alle Gene angesehen, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen untereinander weniger als 97% identisch waren. Diese glichen sich zu 71% bis 96% und wurden als NleA1 bis NleA11 bezeichnet (Abb.13). Die Variante NleA8 wies im C-Terminus Sequenzunterschiede von zehn Aminosäuren auf, die mit bestimmten Serogruppen assoziiert zu sein scheinen. Daher wurde diese Variante in NleA8-1 und NleA8-2 unterschieden (Abb. 13). Darüber hinaus zeigte NleA6 eine stammspezifische Variation, die bei dem *E. coli* O156:H25 Stamm CB8745 zu einer Insertion von vier Aminosäuren und einem Austausch von vier Aminosäuren führte im Vergleich zu anderen NleA6-positiven Stämmen. Aus diesem Grund wurde NleA6 gleichfalls in NleA6-1 und NleA6-2 unterteilt (Abb. 13). Allerdings resultieren diese Variationen auch in einem unterschiedlichen Restriktionsmuster, da diese Mutationen in der Erkennungssequenz des Enzyms *BseNI* lokalisiert sind. In Abbildung 12 sind diese Unterschiede für *nleA8-1* in Spur 8 und *nleA8-2* in Spur 9, sowie für *nleA6-1* in Spur 6 und *nleA6-2* in Spur 11 erkennbar.

Der offene Leserahmen von *nleA4* des *E. coli* O84:H2 Stammes CB7197 besitzt etwa 70 Basenpaare stromabwärts des Startcodons eine fünffache Insertion der Purinbase Guanin. Durch die resultierende Leserasterverschiebung ist das kodierte Protein N-terminal verkürzt und vermutlich nicht mehr funktionell (Abb. 13). In Abbildung 13 ist für diese Variante die komplette, zwischen zwei Stoppcodons gelegene, abgeleitete Aminosäuresequenz dargestellt. Das potentielle Protein ist 46 bis 78 Aminosäuren kürzer als diese Sequenz. Die genaue Größe wurde für dieses Protein nicht definiert, da 90 und 96 bp stromaufwärts des ersten Startcodons AUG zwei alternative Startcodons TTG in der Sequenz vorhanden sind (Abb. 13).

Die unterschiedlichen Varianten weisen verschiedene Längen auf, die sich bei der abgeleiteten Proteinsequenz zwischen 412 und 462 Aminosäuren bewegen. Diese Unterschiede kommen wie bei den bereits bekannten Varianten durch eine mehrfache Insertion, insbesondere der Aminosäuren Alanin, Serin und Threonin, etwa in der Mitte der potentiellen Proteine zustande (Abb. 13, Kapitel 4.2.1). Bei dem *Espl-like* Protein und den Varianten NleA1, NleA2, NleA7, NleA10 und NleA von *C. rodentium* fehlt diese Region dagegen vollständig. Darüber hinaus ist bei diesen Proteinen laut bioinformatischer Analyse nur eine potentielle membranspannende Domäne vorhanden, da eine weitere Domäne in dieser nicht vorhandenen Region

	1										100
NleA ₄₇₉₅	MNIQPIVQSG	ITTQNNQHHQ	R-EQIP-PTQ	IPQSELPNGC	EAGFVVNIPD	DIQQHAPECG	ETTALLSLIK	DKGLLSGLDE	YIAPHLEEGS	IGKKTLDMFG	
Z6024TI...	..S.....	T-....-S..L..	Q.....	
Espl-like	..V..N.HT.	L.PPLHLA.P	P--HPA-.N.	..E...P..	.T.....ET...G..RA	.L.....	A...A.....	
NleA1H	T-..TS-H..	.T.....EI...G..RA	.L.....	A...A.....	
NleA2TI...H...H	T-..T-...L..	Q.....A	A...A.....	
NleA3N.	A-K.A.-.A.H..R.....Q	.E.....K	.L.....	A...A.....	
NleA4	-----	-----SGR	T-SAP-.A.H..R.....Q	.E.....K	.L.....	A...A.....	
NleA5TI...H...H	T-..T-...L..	Q.....A	A...A.....	
NleA6-1N.	A-.A-.A.H..R.....Q	.E.....K	.L.....	A...A.....	
NleA6-2N.	A-.A-.A.	..V....H..R.....Q	.E.....K	.L.....	A...A.....	
NleA7TI...H...H	T-..T-...L..	Q.....V.....A	A...A..T..	
NleA8-1T..R..H	A-..TS-T...H..E	.M.R.....E.....K	.L.....	A...A.....	
NleA8-2T..R..H	A-..TS-T...H..E	.M.R.....E.....K	.L.....	A...A.....	
Nle9N.	A-K.A.-.A.H..R.....Q	.E.....K	.L.....	A...A.....	
NleA10TI...H...H	T-..T-...L..	Q.....	..R.....G..RA	.L.....	A...A.....	
NleA11TI...H...H	T-..T-...L..	Q.....V.....A	A...A.....	
NleANIH..Q.H	HA..V.VSSS	..R.D..PN.H..EV....E.....K	.L.....	L...A..T..	

	101									200
NleA ₄₇₉₅	LFNVTQMALE	IPSSTVPSIS	GKYGVQMNIV	KPDIHPTSGS	YFLQIFPLHD	EIGFNFKDLP	GPLKNALSNS	NISTTAVSTI	----ASAATS	AATSAASTAV
Z6024-SG..L..N	-----	-----...
Espl-like-G..T.N	...L....	.V.I..GA..	...QKF..--	-----	-----	-----
NleA1-G..T.N	...L....	.V.I..GA..	...QKF..--	-----	-----	-----
NleA2-G..T.N	...L....	.V.I..GA..	...QKF..--	-----	-----	-----
NleA3G..L..NI.....P..	-----	-----.
NleA4-T...G..L..NI.....P..	-----	-----.
NleA5G..L..NI.....P..	-----	-----.
NleA6-1-G..N	-----	-----
NleA6-2-R...G..N	ASAAT.....
NleA7G..T.N	.V..L..A..	...I.YR..Q	...V..--	-----	-----	-----
NleA8-1	...S....-G..L..NI.....P..	-----	-----.
NleA8-2	...S....-G..L..NI.....P..	-----	-----.
Nle9G..L..NI.....P..	-----	-----.
NleA10-GV..T.N	.V..L..A..	...I.YR..	...V..--	-----	-----	-----
NleA11G..N	-----	-----
NleA-G..T.N	...L....T..	S..A..--	-----	-----

	201									300
NleA ₄₇₉₅	STIASTGTSA	TTSTVTTEPK	DPIPWFLGTA	QVVRNHGVEL	PIVKTENGWK	LVGETPLTPD	GPKANYTEEW	VIRPGEADFK	YGASPLQATL	GLEFGAHFKW
Z6024
Espl-like	-----	-----Q	N.N...V..I..D...EF.L.	..ST...S..
NleA1	-----	-----Q	N.N...V..I..D...EF.L.	..ST...S..
NleA2	-----	-----Q	N.N...V..I..D...EL.L.	..ST.F.S..
NleA3	..A...IA..AS.	.L.....K...V...	..T.....
NleA4	..A...IA..AS.	.L.....K...V...	..T.....
NleA5	..A...IA..AS.	.L.....K...V...	..T.....
NleA6-1	.A.T.AA...L.....T.....
NleA6-2	.A.T.AA...L.....T.....
NleA7	-----	-----S	.AV.....A...L.	..T...F...
NleA8-1	..A...IA..AS.
NleA8-2	..A...IA..AS.
Nle9	..A...IA..AS.	.L.....K...A...L.	..T...F...
NleA10	-----	-----S	.AV.....A...L.	..T...F...
NleA11	---.....A...T.....
NleA	-----	--...APT.N	.M.....T.....

	301									400
NleA ₄₇₉₅	DLDPNTKYA	VLTNAATNAV	GAAGGFAVSR	LPGVDPMLAP	HIGSMAGQAL	GHAVQCYTPG	LKPDTILWWA	GTTLGLADLN	KAIEGVARFT	DYPRIWWHAR
Z6024A..L..	FAST...S.	...A.V...A	...I.YN...A...A...	...E.....
Espl-likeLA..AYTL.Q	YT.T.A..S.	.V.....T.EG...
NleA1	I.....LA..AYTL.Q	YT.T.A..S.	.V.....T.EG...
NleA2LA..AYTL.Q	YT.TNA..S.
NleA3	...S.....A..L	K I...S...	...A.V...A	...I..N...T.E.....
NleA4	...S.....A..L	K I...S...	...A.V.VA	...I..N...T.E.....
NleA5	...S.....A..L	K I...S...	...A.V...A	...I..N...T.E.....
NleA6-1A..L	K I...S...	...A.V...A	...I..N...T.E.....
NleA6-2A..LQ I...	S...S...	...A.V...A	...I..N...E.....
NleA7	...SR....	I.....A...
NleA8-1A..L..	...V.....	FT.T...S.	...A.V...A	...I.YN...T.EG...
NleA8-2A..L..	...V.....	FT.T...S.	...A.V...A	...I.YN...E.....
Nle9	...R.....	I.....A...A...A...	...YDK...
NleA10	...R.....A...T..AV	...N.Q.T.EG...
NleA11I.....A..LI.K IA.V...A	...I..N...T.E.....
NleA	I.....A..IK V..I	...S.	.V.A.L...A	...N...A.F.A...	...DKV...F...

	401								
NleA ₄₇₉₅	EGAI FPNKED	IARATGADIR	AMEEGVPVDH	RHPHPEDVVI	DIES-S-PHN	NPSNYVDTV	IIRETRV	459	
Z6024A.	.EH.....I..GQ	...N.....NGL..HH..IF.	..Q....	441	
Espl-likeI..GQ	...N.....NGL..HH..IF.	..Q....	412	
NleA1I..GQ	...N.....NGL..HH..IF.	..Q....	413	
NleA2I..GQ	...N.....NGS..HF.	413	
NleA3-.-.	439	
NleA4GQ	S..R.....	N...YDL..H	..L.H..I..	423	
NleA5-.-.	439	
NleA6-1-.-.	458	
NleA6-2-.-.	462	
NleA7I..GQ	...N.....NDS..HF.	414	
NleA8-1I..GQ	...N.....NGS..HF.	..Q....	440	
NleA8-2A.	.EH.....S.GQ	...N.....	N...NNS..HQ....	440	
Nle9A.	.EH.....GQ	...N.....NDL..H	..L.H..IF.	441	
NleA10I..GQ	...N.....NGS..HF.	413	
NleA11T...I..GQ	...K.....NGS..HN.F.	..Q....	442	
NleA	...L....Q.	...V.....KG.	Q..K.....	...GGNS..HFE	..Q....	430	

Abbildung 13: Vergleich der Aminosäuresequenz von NleA₄₇₉₅ des *E. coli* Stammes 4795/97 mit Z6024 des *E. coli* Stammes EDL933, dem Espl-like Protein des *E. coli* Stammes E22, mit NleA1 des *E. coli* Stammes LTEC94460, NleA2 des *E. coli* Stammes DG522/3, NleA3 des *E. coli* Stammes 4557/99, NleA4 des *E. coli* Stammes CB7197, NleA5 des *E. coli* Stammes 0917/99, NleA6-1 des *E. coli* Stammes CB4973, NleA6-2 des *E. coli* Stammes CB8745, NleA7 des *E. coli* Stammes CB6116, NleA8-1 des *E. coli* Stammes 3439/00, NleA8-2 des *E. coli* Stammes CB8966, NleA9 des *E. coli* Stammes CB6389, NleA10 des *E. coli* Stammes CB7690, NleA11 des *E. coli* Stammes DG264/4 und NleA des *C. rodentium* Stammes DBS100. Identische Aminosäuren sind durch einen Punkt und fehlende Aminosäuren einer Sequenz sind durch einen Strich dargestellt. Grau unterlegt sind die potentiellen membranspannenden Domänen.

lokalisiert wäre. Alle weiteren Varianten weisen zwei mögliche membranspannende Domänen auf (Abb. 13). Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen zeigt neben den variablen N- und C-Termini größere konservierte Bereiche im Mittelteil der einzelnen Proteine.

Die DNA-Sequenzierung führte zur Identifizierung von drei verschiedenen *nleA*-Varianten, die das gleiche Restriktionsmuster wie *espl-like* aufwiesen (Abb. 13). Zur Unterscheidung dieser Varianten *espl-like*, *nleA1* und *nleA2* bei allen betreffenden Stämmen wurden, mit Hilfe von V83-for2 und V83-rev2 generierte PCR-Produkte einer Restriktionsanalyse unter Verwendung der Enzyme *Bpu1102I* bzw. *CseI* unterzogen. Weiterhin zeigte die Sequenzanalyse die Existenz von zwei verschiedenen Restriktionsmustern für *nleA8-1* nach der DNA-Spaltung mit *BseNI*. Aufgrund einer einzigen Punktmutation innerhalb des offenen Leserahmens in der Erkennungssequenz von *BseNI* traten Restriktionsmuster wie in Abbildung 12 in Spur 4 und 8 sichtbar auf. Zur Trennung von *nleA8-1* von den Varianten *nleA3* und *nleA4*, deren Restriktionsmuster den in Spur 4 dargestellten Banden glich (Abb. 12), wurden die PCR-Produkte der entsprechenden Stämme mit den Restriktionsendonukleasen *BclI*, *NheI* bzw. *SphI* geschnitten. Für alle weiteren Varianten wurde mit der Sequenzierung das erhaltene Restriktionsmuster bestätigt, was allen Vertretern einer *nleA*-Variante eindeutig zugeordnet werden konnte. Die Verteilung der einzelnen Varianten in den 149 *nleA*-positiven Stämmen ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Verteilung der *nleA*-Varianten, sowie relevante Sero- und Genotypen der 170 untersuchten STEC und EPEC Stämme und Ergebnisse der Southern-Hybridisierung mit einer *nleA*₄₇₉₅-Sonde.

Stamm	Serotyp	Herkunft	Krankheit	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>nleA</i>	Hybridisierung
7161/95	O26:H11	Human	unbekannt	1	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	8,6 kb/11,8 kb
4740/97	O26:H11	Human	Diarrhöe	1	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
1530/99	O26:H11	Human	HUS	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
3820/99	O26:H11	Human	HUS	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	
3849/99	O26:H11	Human	HUS	2	β	8-1	25 kb
3900/99	O26:H11	Human	HUS	1	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
2983/00	O26:H11	Human	HUS	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
3439/00	O26:H11	Human	unbekannt	2	β	8-1	25 kb
1247/95	O26:H ⁻	Human	unbekannt	1/2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	8,6 kb/11,8 kb
3967/96	O26:H ⁻	Human	AS	1	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
4993/96	O26:H ⁻	Human	HUS	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
5720/96	O26:H ⁻	Human	HUS	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
6105/96	O26:H ⁻	Human	Diarrhöe	1	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
2569/98	O26:H ⁻	Human	Diarrhöe	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
2164/99	O26:H ⁻	Human	AS	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
3416/99	O26:H ⁻	Human	unbekannt	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
1150/00	O26:H ⁻	Human	HUS	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
2331/01	O26:H ⁻	Human	HUS	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	12 kb/24 kb
CB8750	O49:H2	Human	Diarrhöe	-	β	-	
CB8751	O49:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	
CB8752	O49:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	20 kb
CB8755	O49:H2	Kaninchen	unbekannt	-	-	-	
CB8756	O49:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	20 kb
CB8754	O49:H10	Hund	unbekannt	-	κ	<i>z6024</i>	9 kb
DG270/3	O49:H18	Schwein	unbekannt	-	κ	2	16 kb
DG522/3	O49:H35	Rind	unbekannt	-	κ	2	17 kb
CB7690	O49:NM	Human	HC	-	κ	10	4,8 kb
CB8519	O49:NM	Hund	Diarrhöe	-	-	-	
CB9181	O49:NM	Schwein	unbekannt	-	β	8-1/8-1	4,5 kb/23 kb
CB9182	O49:NM	Schwein	unbekannt	-	β	8-1/8-1	4,5 kb/23 kb
CB9204	O49:NM	Schwein	unbekannt	-	β	8-1/8-1	4,5 kb/23 kb
DG104/2	O49:NM	Rind	unbekannt	-	κ	-	kein Signal

Stamm	Serotyp	Herkunft	Krankheit	stx	eae	nleA	Hybridisierung
CB7197	O84:H2	Rind	unbekannt	1	ζ	4	24 kb
00-09296	O84:H2	Human	Diarrhöe	1	ζ	8-2*/9	7 kb/30 kb
03-00794	O84:H2	Human	unbekannt	1	ζ	8-2*/9	30 kb
03-06145	O84:H2	Human	Diarrhöe	1	ζ	7/8-2*	6,8 kb/30 kb
4795/97	O84:H4	Human	Diarrhöe	1	ζ	<i>nleA</i> ₄₇₉₅	11 kb
00-04728	O84:H28	Human	unbekannt	1	ζ	<i>nleA</i> ₄₇₉₅	
01-08612	O84:H28	Human	unbekannt	1	ζ	<i>nleA</i> ₄₇₉₅	11 kb
CB6116	O84:H ⁻	Schaf	unbekannt	1	ζ	7/8-2*	6,8 kb/30 kb
CB8966	O84:H ⁻	Schwein	unbekannt	-	θ	8-1 [#] /8-2	13 kb/25 kb
7793/96	O84:H ⁻	Human	Diarrhöe	1	ζ	8-2*/9	30 kb
02-02601	O84:H ⁻	Human	Diarrhöe	1	ζ	7/8-2*	6,8 kb/30 kb
04-01724	O84:H ⁻	Rind	unbekannt	1	ζ	7/8-2*	6,8 kb/30 kb
CB6389	O84:nt	Human	Diarrhöe	1	ζ	8-2*/9	7 kb/30 kb
CB6403	O84:nt	Human	Diarrhöe	1	ζ	7/8-2*	6,8 kb/30 kb
03-00175	O84:nt	Human	Diarrhöe	1	ζ	9	30 kb
03-07769	O84:nt	Human	unbekannt	1	ζ	7/8-2*	6,8 kb/30 kb
CB3349	O103:H2	Human	SIDS	-	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
CB7252	O103:H2	Human	unbekannt	1	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
CB8432	O103:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i> /11	7 kb/ 24,5 kb
E22	O103:H2	Kaninchen	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	13 kb
FH303	O103:H2	Human	unbekannt	1	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
HBI/01	O103:H2	Fleisch		1	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
PMK5	O103:H2	Human	HUS	1	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
S21195	O103:H2	Human	unbekannt	1	-	<i>espl-like</i>	24,5 kb
UTI	O103:H2	Human	HWI	1	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
889	O103:H2	Huhn	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	13 kb
3942/96	O103:H2	Human	HUS	1	ε	<i>espl-like</i>	
5579/96	O103:H2	Human	AS	1	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
2576/97	O103:H2	Human	HUS	2	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
2969/99	O103:H2	Human	HUS	2	ε	<i>espl-like</i>	
1557/00	O103:H2	Human	HUS	2	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
1741/01	O103:H2	Human	HUS	1	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
CA92-7164	O103:H7	Hund	Diarrhöe	-	-	-	
92-1695	O103:H11	Human	unbekannt	1	β	8-1	25 kb
1246/97	O103:H18	Human	Diarrhöe	1	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
2636/97	O103:H ⁻	Human	HUS	2	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
4210/98	O103:H ⁻	Human	HUS	1	ε	<i>espl-like</i>	24,5 kb
4537/98	O103:H ⁻	Human	Diarrhöe	1	ε	<i>espl-like</i>	

Stamm	Serotyp	Herkunft	Krankheit	stx	eae	nleA	Hybridisierung
4484/86	O111:H2	Human	unbekannt	-	θ	<i>z6024</i>	11,2 kb
221-2-87	O111:H2	Human	unbekannt	-	β	<i>espl-like</i>	25 kb
5721/96	O111:H2	Human	Diarrhöe	1	θ	8-1	27 kb
5727/96	O111:H2	Human	Diarrhöe	1	θ	8-1	
CL37	O111:H8	Human	HUS	1	θ	8-1	27 kb
95NR1	O111:H ⁻	Human	HUS	1/2	θ	8-1	27 kb
1639/77	O111:H ⁻	Human	Diarrhöe	1	θ	8-1	27 kb
2/85	O111:H ⁻	Human	HUS	1	θ	8-1	27 kb
165/87	O111:H ⁻	Human	unbekannt	-	β	<i>espl-like</i>	
4417/96	O111:H ⁻	Human	HUS	1	θ	8-1	27 kb
5380/96	O111:H ⁻	Human	Diarrhöe	1	θ	8-1	
6037/96	O111:H ⁻	Human	HUS	1/2	θ	8-1	
5556/97	O111:H ⁻	Human	Diarrhöe	1	θ	8-1	
6366/97	O111:H ⁻	Human	HUS	1/2	θ	8-1	27 kb
3997/98	O111:H ⁻	Human	HUS	1/2	θ	8-1	
4556/99	O111:H ⁻	Human	Diarrhöe	1	θ	8-1	27 kb
1187/00	O111:H ⁻	Human	HUS	1/2	-	8-1	27 kb
2516/00	O111:H ⁻	Human	HUS	1/2	θ	8-1	
3385/00	O111:H ⁻	Human	HUS	1/2	θ	8-1	
4725/00	O111:H ⁻	Human	HUS	1/2	θ	8-1	
CB130	O128:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	20 kb
CB132	O128:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	
CB137	O128:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	
CB182	O128:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	
CB473	O128:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	
CB8937	O128:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	20 kb
CB8940	O128:H2	Kaninchen	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	20 kb
Cigleris	O128:H2	Human	Diarrhöe	-	β	<i>espl-like</i>	20 kb
DG128/1	O128:H2	Schaf	AS	1/2	-	-	
DG483/2	O128:H2	Huhn	AS	-	β	<i>espl-like</i>	20 kb
T4/97	O128:H2	Taube	AS	2f	β	<i>espl-like*</i>	10 kb
3172/97	O128:H2	Human	Diarrhöe	1/2	-	-	
3600/97	O128:H2	Human	AS	1/2	-	-	
5998/97	O128:H2	Taube	AS	2f	β	<i>espl-like</i>	
3201/98	O128:H2	Human	Diarrhöe	1/2	-	-	kein Signal
H.I.8.	O128:B12	Human	Diarrhöe	2f	β	<i>espl-like</i>	10 kb
3560/96	O128:H ⁻	Human	Diarrhöe	1	-	-	
3117/98	O128:H ⁻	Human	Diarrhöe	1/2	-	-	
4736/98	O128:H ⁻	Human	AS	1/2	-	-	

Stamm	Serotyp	Herkunft	Krankheit	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>nleA</i>	Hybridisierung
7476/96	O145:H4	Human	unbekannt	-	ι	-	kein Signal
CB4973	O145:H28	Human	HUS	2	γ	6-1	9,8 kb
CB6242	O145:H28	Human	Diarrhöe	1	γ	5	5,5 kb
CB8482	O145:H28	Human	Diarrhöe	-	-	-	
DG264/4	O145:H28	Schwein	AS	-	γ	11	19 kb
0917/99	O145:H28	Human	Diarrhöe	1	γ	5	5,5 kb
4557/99	O145:H28	Human	HUS	2	γ	3	5 kb
CB8480	O145:H34	Human	Diarrhöe	-	ι	-	kein Signal
CB7110	O145:NM	Rind	AS	1	γ	2	30 kb
CB8104	O145:NM	Human	HUS	2	γ	2	30 kb
CB8971	O145:NM	Schwein	unbekannt	-	γ	2	
4865/96	O145:NM	Human	HUS	2	γ	2	30 kb
2074/97	O145:NM	Human	HUS	1	γ	2	30 kb
4392/97	O145:NM	Human	HUS	2	β	<i>z6024</i>	31 kb
0893/98	O145:NM	Human	HUS	2	γ	2	
1406/98	O145:NM	Human	Diarrhöe	2	γ	2	
4672/99	O145:NM	Human	HUS	1/2	γ	2	30 kb
5122/99	O145:NM	Human	HUS	2	γ	2	
1695/00	O145:NM	Human	HUS	2	γ	2	
3358/00	O145:NM	Human	Diarrhöe	1	γ	2	30 kb
LTEC94460	O156:H1	Human	AS	-	ζ	1	6 kb
CB737	O156:H8	Schwein	Diarrhöe	-	θ	<i>z6024</i>	
CB6951	O156:H8	Human	unbekannt	-	θ	-	
CB8170	O156:H8	Human	unbekannt	-	θ	-	
CB8747	O156:H8	Human	unbekannt	-	θ	-	kein Signal
DG264/1	O156:H8	Schwein	unbekannt	-	θ	<i>z6024</i>	9 kb
KK72/5	O156:H8	Human	AS	-	θ	-	kein Signal
CB647	O156:H21	Rind	unbekannt	1	ζ	3/8-2*	4,8 kb/6,2 kb
CB7586	O156:H21	Human	Diarrhöe	1/2	-	-	
CB7263	O156:H25	Human	AS	1	ζ	3/8-2*	4,8 kb/6-2 kb
CB8745	O156:H25	Human	unbekannt	-	θ	6-2/8-2*	6,2 kb/9,8 kb
CB8746	O156:H25	Human	unbekannt	-	ζ	6-1/8-2*	6,2 kb/9,8 kb
PT199	O156:H25	Schaf	unbekannt	1	ζ	6-1/8-2*	6,2 kb/11,5 kb
PT207	O156:H25	Schaf	unbekannt	1	ζ	6-1/8-2*	6,2 kb/11,5 kb
PT256	O156:H25	Schaf	unbekannt	1	ζ	6-1/8-2*	6,2 kb/11,5 kb
PT272	O156:H25	Schaf	unbekannt	1	ζ	6-1/8-2*	6,2 kb/11,5 kb
173a152541	O156:H25	Rind	unbekannt	-	ζ	3/8-2*	5,5 kb/6,2 kb

Stamm	Serotyp	Herkunft	Krankheit	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>nleA</i>	Hybridisierung
EDL933	O157:H7	Fleisch		1/2	γ	<i>z6024</i>	
19665/91	O157:H7	Human	Diarrhöe	-	γ	<i>z6024</i>	10 kb
0136/96	O157:H7	Human	HUS	1/2	γ	<i>z6024</i>	12 kb
3010/96	O157:H7	Human	Diarrhöe	2	γ	<i>z6024</i>	
4367/97	O157:H7	Human	Diarrhöe	2	γ	<i>z6024</i>	12 kb
5049/97	O157:H7	Human	HUS	1/2	γ	<i>z6024</i>	
4791/98	O157:H7	Human	HUS	1/2	γ	<i>z6024</i>	
4544/99	O157:H7	Human	AS	1/2	γ	<i>z6024</i>	
2483/00	O157:H7	Human	HUS	2	γ	<i>z6024</i>	
2448/01	O157:H7	Human	HUS	2	γ	<i>z6024</i>	12 kb
5531/96	O157:H ⁻	Human	Diarrhöe	1/2	γ	<i>z6024</i>	12 kb
6790/96	O157:H ⁻	Human	unbekannt	-	γ	<i>z6024</i>	
3935/97	O157:H ⁻	Human	HUS	2	γ	<i>z6024</i>	12 kb
4180/97	O157:H ⁻	Human	HUS	2	γ	<i>z6024</i>	
2050/98	O157:H ⁻	Human	AS	1/2	γ	<i>z6024</i>	12 kb
3573/98	O157:H ⁻	Human	HUS	2	γ	<i>z6024</i>	
2696/99	O157:H ⁻	Human	HUS	2	γ	<i>z6024</i>	
3998/99	O157:H ⁻	Human	AS	2	γ	<i>z6024</i>	
1855/00	O157:H ⁻	Human	Enteritis	1/2	γ	<i>z6024</i>	
2492/00	O157:H ⁻	Human	HUS	2	γ	<i>z6024</i>	9 kb
RDEC-1	O15:H ⁻	Kaninchen	Diarrhöe	-	β	<i>z6024</i>	
6044/95	O118:H5	Human	unbekannt	-	κ	<i>z6024</i>	
CF11201	O125:H ⁻	Human	Diarrhöe	-	η	8-2	12 kb
E2348/69	O127:H6	Human	unbekannt	-	α	-	kein Signal

AS: asymptomatisch; HWI: Harnwegsinfektion; SIDS: plötzlicher Säuglingstod;

#: Deletion eines bp im Gen; *:Deletion des 5'-Endes des Gens

Die Verteilung der *nleA*-Varianten zeigt unter Einbezug der *E. coli* Serogruppen ein heterogenes Bild. So weisen Serogruppen, die mit schwerwiegenderen Krankheitssymptomen assoziiert sind, überwiegend nur eine Variante auf. Für *E. coli* O26 Stämme wurden *z6024* und *nleA8-1* detektiert. Die meisten untersuchten O111 Isolate besitzen ebenfalls *nleA8-1* und alle O157 Stämme *z6024*. In den überprüften O103 Isolaten ist *espl-like* die vorherrschende Variante. Dagegen sind in der Serogruppe O145 nur die O145:NM Isolate sehr einheitlich, während die sechs charakterisierten O145:H28 Stämme vier verschiedene *nleA*-Varianten aufweisen. Weiterhin

konnte bei der Serogruppe O128 nur das *espl-like* Gen detektiert werden. Bei den 14 bis 17 untersuchten Isolaten der Serogruppen O49, O84 und O156, die selten mit schwereren Krankheitsverläufen in Verbindung gebracht werden, treten dagegen vier bis sechs verschiedene *nleA*-Varianten auf (Tab. 12).

Weiterhin trägt die Mehrzahl der *E. coli* O26 und O84 Stämme zwei Kopien des Gens *nleA* in ihrem Genom. Dies gilt auch für ca. die Hälfte der O156 Isolate, den O103:H2 Stamm CB8432 und drei aus Schweinen isolierte O49:NM Stämme (Tab. 12, Kapitel 4.3.4). Mit Ausnahme der drei O49:NM Isolate, die wahrscheinlich aus einem Tierbestand stammen, weisen alle Stämme mit zwei Kopien verschiedene Varianten des Gens *nleA* auf. Außerdem ist bei all diesen O26, O84 und O156 Isolaten jeweils eine Kopie deletiert und zum Großteil wahrscheinlich nicht mehr funktionell (Tab. 12). So tragen alle Varianten *z6024* der Serogruppe O26 eine Deletion 270 bp stromabwärts des Startcodons, woraus eine verkürzte abgeleitete Aminosäure-sequenz resultiert. Auch der O84:H⁻ Stamm CB8966 weist innerhalb des Gens *nleA8-1* eine Deletion 130 bp stromabwärts des Startcodons auf. Alle weiteren, zwei *nleA*-Kopien aufweisenden, O84 Stämme tragen ein deletiertes Gen *nleA8-2*, aufgrund der Insertion eines ISEc8-Elementes 651 bp stromaufwärts des Stoppcodons. Dagegen fehlen 117 bp des 5'-Endes bei allen *nleA8-2* Genen der Serogruppe O156. Laut Sequenzanalyse ähnelt diese Region einem DNA-Bereich des Phagen BP-4795, der sich 179 bp stromaufwärts befindet. Weiterhin besteht eine Ähnlichkeit zu einem ISEc8-Element, so dass der Verlust des 5'-Endes dieses Gens wahrscheinlich mit der Insertion eines IS-Elementes einherging. Darüber hinaus wurde für das *espl-like* Gen des O128:H2 Isolates T4/97 eine Deletion der ersten 34 Basenpaare durch Insertion eines IS-Elementes festgestellt. Im Gegensatz dazu besitzt das O182:H2 Isolat CB8940 den vollständigen Leserahmen der Variante *espl-like*.

In 64 Stämmen und somit am häufigsten wurde die Variante *nleA8* detektiert. Dabei ist ein komplettes Gen für *nleA8-1* in den Serogruppen O26 und O111 vorhanden, während die Serogruppen O84 und O156 überwiegend ein deletiertes Gen für *nleA8-2* aufweisen (Tab. 12). Des weiteren tragen 43 Stämme vor allem der Serogruppen O26 und O157 das Gen *z6024* und 37 Stämme, insbesondere der Serogruppen O103 und O128, die Variante *espl-like*. Alle weiteren Variante wurden in geringerem Maße nachgewiesen. So kommt das Gen *nleA2* bei elf O145:NM Stämmen und zwei O49 Isolaten vor. Die heterogene Serogruppe O84 umfasst jeweils drei, fünf

und sechs untersuchte Stämme mit den Varianten *nleA*₄₇₉₅, *nleA*9 bzw. *nleA*7. Die Varianten *nleA*6 und *nleA*3 wurden bei sieben bzw. vier Isolaten detektiert, während jeweils lediglich ein untersuchter Stamm die Variante *nleA*1, *nleA*4 oder *nleA*10 aufweist. Darüber hinaus tragen zwei O145:H28 Stämme das Gen *nleA*5 und mit Hilfe der Oligonukleotide V83-for2 und V83-rev3 konnte bei zwei Stämmen die Variante *nleA*11 amplifiziert werden (Tab. 12).

Insgesamt konnte das Intimin-kodierende Gen *eae* bei 156 *E. coli* Isolaten nachgewiesen werden, wobei *eae*-β bei 45, *eae*-γ bei 36, *eae*-θ bei 25, *eae*-ζ bei 24, *eae*-ε bei 16, *eae*-κ bei sechs und *eae*-ι bei zwei Isolaten vorhanden ist. Dagegen wurden neben den Referenzstämmen E2348/69 für *eae*-α und CF11201 für *eae*-η keine weiteren *E. coli* Stämme gefunden, die diese *eae*-Subtypen tragen (Tab. 12). Während sich die *eae*-α- bzw. *eae*-ι-tragenden Stämme als *nleA*-negativ herausstellten, besitzt der Referenzstamm CF11201 die Variante *nleA*8-2. Die sechs *eae*-κ-positiven O49 Stämme weisen die Varianten *z6024*, *nleA*2 bzw. *nleA*10 auf. Im Gegensatz dazu sind alle O103 Isolate mit dem *eae*-ε Gen *espl-like*-positiv. Die Intimin-kodierenden Gene *eae*-β und *eae*-θ sind in den untersuchten *E. coli* Isolaten vor allem mit den Varianten *nleA*8-1, *espl-like*, *z6024* aber auch *nleA*11 bzw. *z6024*, *nleA*8-1, *nleA*8-2 und *nleA*6-2 assoziiert. Ein sehr heterogenes Bild zeigen *eae*-γ-positive Stämme mit den Varianten *z6024*, *nleA*2, *nleA*3, *nleA*5, *nleA*6-1 oder auch *nleA*11. Dies gilt ebenfalls für *eae*-ζ-tragende Isolate mit den Varianten *nleA*₄₇₉₅, *nleA*1, *nleA*3, *nleA*4, *nleA*6-1, *nleA*7, *nleA*8-2 bzw. *nleA*9 (Tab. 12).

4.3.4. Bestimmung der Kopienzahl von *nleA* im Genom von STEC und EPEC

Aufgrund der Ergebnisse der Restriktionsanalyse und Probleme während der DNA-Sequenzierung sollte ein mehrfaches Auftreten von Varianten des Gens *nleA* im Genom ausgewählter *E. coli* Stämme überprüft werden.

Für die Southern-Blot Hybridisierung wurden 10 µg zuvor präparierter genomischer DNA mit dem Restriktionsenzym *Mlu*I für 24 Stunden bei 37°C geschnitten, unter Verwendung einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Nylonmembran mit Hilfe einer *nleA*₄₇₉₅-Sonde detektiert. Als Sonde wurde unter Verwendung der Oligonukleotide V83-for2 und V83-rev3 ein Fragment des *nleA*₄₇₉₅-Gens des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97 amplifiziert, aufgereinigt und

mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) markiert.

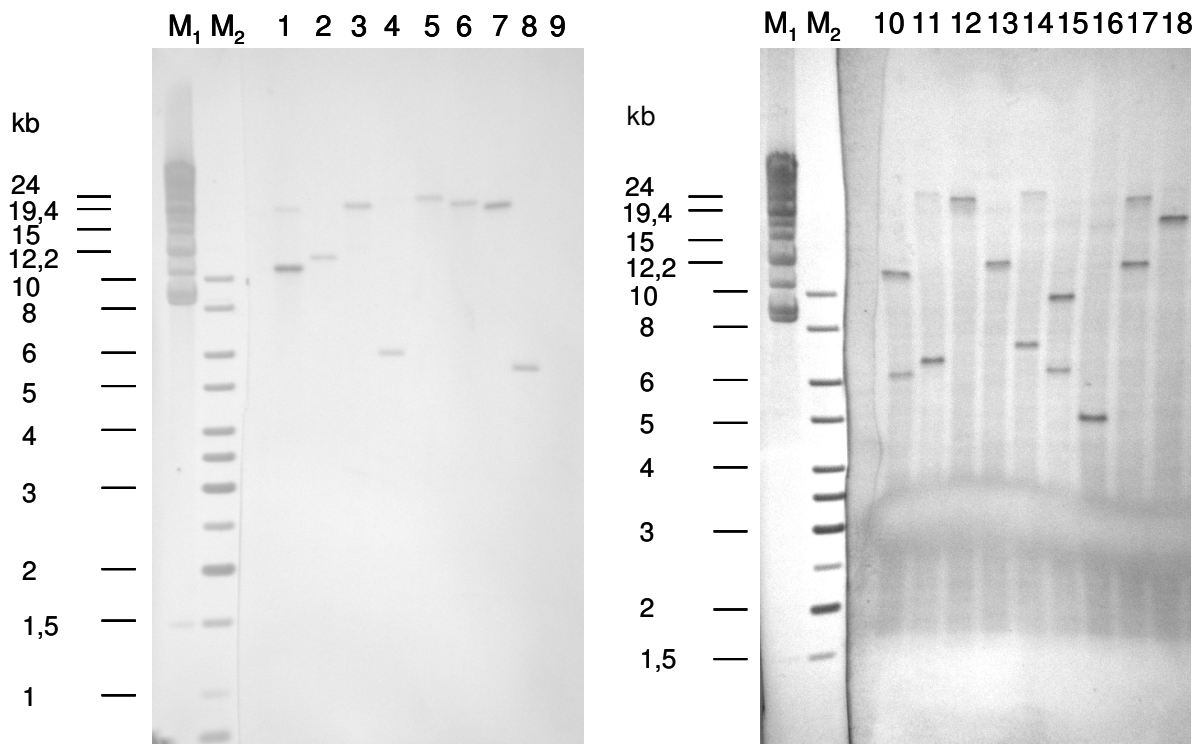


Abbildung 14: Southern-Blot Hybridisierung verschiedener *nleA*-Varianten unter Verwendung einer *nleA*₄₇₉₅-Sonde. Aufgetragen wurden die *E. coli* Stämme in Spur 1: 4795/97 (*nleA*₄₇₉₅); Spur 2: 0136/96 (*z6024*); Spur 3: 2576/97 (*espl-like*); Spur 4: LTEC94460 (*nleA*1); Spur 5: 4672/99 (*nleA*2); Spur 6: 5721/96 (*nleA*8-1); Spur 7: CB7197 (*nleA*4); Spur 8: 0917/99 (*nleA*5); Spur 9: E2348/69 (Negativkontrolle); Spur 10: PT272 (*nleA*6-1, *nleA*8-2); Spur 11: CB6116 (*nleA*7, *nleA*8-2); Spur 12: 3439/00 (*nleA*8-1); Spur 13: CF11201 (*nleA*8-2); Spur 14: CB6389 (*nleA*8-2, *nleA*9); Spur 15: CB8745 (*nleA*6-2, *nleA*8-2); Spur 16: CB7690 (*nleA*10); Spur 17: 5720/96 (*z6024*, *nleA*8-1); Spur 18 DG264/4 (*nleA*11). Als Größenstandards dienten der Lambda Mix Marker, 19 (M₁) und der GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (M₂) der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot).

In Abbildung 14 sind exemplarisch die Ergebnisse der Southern-Blot Hybridisierung genomischer DNA verschiedener *E. coli* Stämme dargestellt. Während für eine Variante der O84 Stämme, wie z. Bsp. bei CB6116 und CB6389, nur ein schwaches Signal erhalten wurde, wahrscheinlich aufgrund der geringen Ähnlichkeit des ver-

kürzten Gens *nleA*8-1 und der *nleA*₄₇₉₅-Sonde, erfolgte die stärkste Bindung der Sonde an das Gen *nleA*₄₇₉₅. Darüber hinaus scheint die Sonde unspezifisch an ein weiteres Gen des Stammes 4795/97 zu binden, der als Positivkontrolle diente, da häufig eine weitere schwache Bande detektiert wurde. Allerdings wurde für diesen Stamm keine weitere Variante des Gens *nleA* im Genom mit Hilfe einer PCR oder der DNA-Sequenzierung nachgewiesen. Für alle untersuchten *E. coli* Stämme wurden ein bis zwei Kopien des Gens *nleA* nachgewiesen und die PCR-Ergebnisse für einige *nleA*-negative Stämme bestätigt (Tab. 12). Interessanterweise erwies sich der O127:H6 Stamm E2348/69 sowohl in der PCR als auch bei der DNA-Hybridisierung als *nleA*-negativ. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen von Gruenheid *et al.* (2004), wonach dieser Stamm das Gen *nleA* trägt. Eventuell handelt es sich bei einem der untersuchten E2348/69 Stämme um eine Mutante des Ursprungsstammes, die entweder dieses Gen verloren oder in ihr Genom integriert hat. Weiterhin zeigen die meisten Stämme einer Serogruppe ein einheitliches Bild. In der Serogruppe O26 zeigen nur die beiden älteren Isolate 1247/95 und 7161/95 ein abweichendes Bandenmuster im Vergleich zu den anderen zwei *nleA*-Kopien tragenden Stämmen (Tab. 12). In der Serogruppe O103 ist dies der Fall für die beiden EPEC Isolate E22 und 889, sowie in der Serogruppe O157 für den O157:H7 Stamm 19665/91 und das O157:H⁻ Isolat 2492/00. Außerdem weisen die *stx*_{2f}-tragenden *E. coli* Stämme der Serogruppe O128 eine andere Fragmentgröße auf als *stx*-negative Isolate dieser Gruppe. Stammspezifische Unterschiede der Lokalisation einer *nleA*-Variante im Genom tritt bei den O156:H25 Isolaten auf. Es handelt sich vermutlich um das intakte Gen *nleA*3 bzw. *nleA*6 (Tab. 12). Des weiteren konnte bei zwei der vier O84 Isolate mit den beiden Varianten *nleA*8-2 und *nleA*9 nur eine Bande mit Hilfe der Southern-Blot Hybridisierung detektiert werden, so dass die entsprechenden Stämme eventuell nach der Restriktionsspaltung mit *Mlu*I *nleA*-tragende DNA-Fragmente gleicher Größe aufweisen oder das Hybridisierungssignal einer Variante unter der Nachweisgrenze des verwendeten Detektionssystems lag.

4.3.5. Horizontaler Gentransfer des Gens *nleA*

Die Lokalisation von *nleA*₄₇₉₅ im Genom eines induzierbaren Prophagen ist bekannt. Daher sollte die Möglichkeit der Übertragung verschiedener *nleA*-Varianten durch horizontalen Gentransfer untersucht werden.

Es wurden 24 pathogene *E. coli* Stämme verschiedener Serotypen ausgewählt, die unterschiedliche Varianten des Gens *nleA* tragen. Zur Induktion von Bakteriophagen wurden Bakterienkulturen mit Norfloxacin versetzt und Phagenlysate präpariert. Zur Transduktion in den Kanamycin-resistenten *E. coli* Laborstamm C600/pK18 wurde das entsprechende Lysat entweder unverdünnt oder 1:10 in SM-Puffer verdünnt eingesetzt. Weiterhin wurde ein Plaquetest mit diesen Verdünnungen durchgeführt, für die Überprüfung der Anwesenheit intakter Phagen, die in der Lage waren, den gewählten Laborstamm zu infizieren. Trat bei präparierten Phagen aus Stämmen der Serogruppen O26, O103, O111, O145 oder O157 eine sehr starke Lyse von C600/pK18 auf, wurde die Transduktion mit einer 1:100 Verdünnung des Phagenlysates wiederholt. Als Matrizen-DNA für die PCR zum Nachweis der Gene *nleA* bzw. *stx* wurden Zellen von fünf Einzelkolonien in einer Suspension vereinigt. Die PCR zur Amplifikation des Gens *nleA* erfolgte mit Hilfe von V83-for2 und V83-rev2. Zur Kontrolle erhaltener Transduktanten wurde zusätzlich eine PCR zum Nachweis des *eae*-Gens mit den Oligonukleotiden SK1 und SK2 durchgeführt. Da es sich bei *eae* um ein chromosomales Gen handelt, konnten die Transduktanten von eventuell auftretenden spontanen Mutanten der pathogenen *E. coli* Wildtyp-Stämme unterschieden werden. Eventuell vorhandene Bakterien der Wildtyp-Stämme nach der Präparation des Phagenlysates sollten allerdings durch das verwendete Antibiotikum eliminiert werden. Darüber hinaus wurde das Gen *nleA*-positiver Transduktanten zur Überprüfung der Variante ansequenziert.

Die Ergebnisse der Transduktion sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Alle Stx2-konvertierenden Bakteriophagen waren induzierbar und konnten in den *E. coli* Laborstamm transduziert werden. Dagegen war es nur möglich die Stx1-Phagen der O84 Stämme CB7197, 01-08612, 4795/97 und CB6389 in C600/pK18 zu übertragen. Von den 24 *nleA*-positiven *E. coli* Stämmen tragen die fünf Isolate CB7690 *nleA*₁₀, 01-08612 *nleA*₄₇₉₅, 4795/97 *nleA*₄₇₉₅, CB6389 *nleA*₉ und CB4973 *nleA*₆₋₁ im Genom eines intakten Bakteriophagen (Tab. 13). Von diesen Isolaten besitzt nur CB6389 zwei Kopien von *nleA* im Genom. Während *nleA*₉ durch horizontalen Gentransfer ü-

bertragen werden konnte, könnte das 5´-seitig deletierte Gen *nleA*8-2 im Genom eines kryptischen Phagen lokalisiert sein.

Tabelle 13: Ergebnisse der Transduktion von Bakteriophagen pathogener *E. coli* in den *E. coli* Laborstamm C600/pK18.

Stamm	Serotyp	Krankheit	<i>stx</i>	<i>eae</i>	<i>nleA</i>	C600/pK18	PBE
1530/99	O26:H11	HUS	2	β	<i>z6024</i> [#] /8-1	<i>stx</i> ₂	+
3439/00	O26:H11	n.b.	2	β	8-1	<i>stx</i> ₂	+
CB7690	O49:NM	HC	-	κ	10	<i>nleA</i> 10	+
CB7197	O84:H2	n.b.	1	ζ	4	<i>stx</i> ₁	+
03-06145	O84:H2	D	1	ζ	7/8-2*	-	-
4795/97	O84:H4	D	1	ζ	<i>nleA</i> ₄₇₉₅	<i>stx</i> ₁ / <i>nleA</i> ₄₇₉₅	-
01-08612	O84:H28	n.b.	1	ζ	<i>nleA</i> ₄₇₉₅	<i>stx</i> ₁ / <i>nleA</i> ₄₇₉₅	+
CB8966	O84:H ⁻	n.b.	-	θ	8-1 [#] /8-2	-	-
CB6389	O84:nt	D	1	ζ	8-2*/9	<i>stx</i> ₁ / <i>nleA</i> 9	-
UTI	O103:H2	HWI	1	ε	<i>espl-like</i>	-	+
2636/97	O103:H ⁻	HUS	2	ε	<i>espl-like</i>	<i>stx</i> ₂	+
1639/77	O111:H ⁻	D	1	θ	8-1	-	+
1187/00	O111:H ⁻	HUS	1/2	-	8-1	<i>stx</i> ₂	+
T4/97	O128:H2	AS	2f	β	<i>espl-like</i> *	<i>stx</i> _{2f}	-
CB4973	O145:H28	HUS	2	γ	6-1	<i>stx</i> ₂ / <i>nleA</i> 6-1	+
DG264/4	O145:H28	AS	-	γ	11	-	+
0917/99	O145:H28	D	1	γ	5	-	+
4557/99	O145:H28	HUS	2	γ	3	<i>stx</i> ₂	+
CB8104	O145:NM	HUS	2	γ	2	<i>stx</i> ₂	+
4392/97	O145:NM	HUS	2	β	<i>z6024</i>	<i>stx</i> ₂	-
4672/99	O145:NM	HUS	1/2	γ	2	<i>stx</i> ₂	-
LTEC94460	O156:H1	AS	-	ζ	1	-	-
PT272	O156:H25	n.b.	1	ζ	6-1/8-2*	-	-
2492/00	O157:H ⁻	HUS	2	γ	<i>z6024</i>	<i>stx</i> ₂	+

n.b.: nicht bekannt; D: Diarrhöe; HWI: Harnwegsinfektion; AS: asymptomatisch; PBE: Plaquebildende Einheiten; #: Deletion eines bp im Gen; *: Deletion des 5´-Endes des Gens

Die Ergebnisse der PCR und die genotypischen Ähnlichkeiten des *E. coli* O84:H28 Stammes mit dem O84:H4 Stamm 4795/97 deuten darauf hin, dass dieses Isolat ebenfalls das Gen *nleA*₄₇₉₅ im Genom eines induzierbaren Stx1-konvertierenden Bakteriophagen trägt. Während der O49:NM Stamm CB7690 *stx*-negativ ist, konnte mit diesen Versuchen nicht geklärt werden, ob der O84:nt Stamm CB6389 und das O145:H28 Isolat CB4973 die betreffende Variante des Gens *nleA* ebenfalls im Genom des Stx-konvertierenden Phagen tragen oder ob es sich um zwei verschiedene induzierbare Bakteriophagen handelt.

Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere der 24 *E. coli* Stämme induzierbare *nleA*-tragende Phagen besitzen, diese allerdings nicht in der Lage sind den *E. coli* Laborstamm C600/pK18 zu infizieren. So besitzen zwar alle untersuchten O26, O49, O103, O111 und O157 Stämme Phagen, die in der Lage sind C600/pK18 zu lysieren. Allerdings wurden für einige Stämme der Serogruppen O84, O128 und O145 Transduktanten erhalten, während keine Plaquebildung mit präpariertem Phagenlysat dieser Stämme nachweisbar war (Tab. 13). Somit besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass die O84 Stämme 03-01645 und CB8966, sowie die beiden untersuchten O156 Isolate induzierbare Bakteriophagen tragen, die bei diesem Ansatz nicht identifiziert werden konnten.

4.4. Bioinformatische Analyse von NleA₄₇₉₅

Die abgeleitete Aminosäuresequenz von NleA₄₇₉₅ wurde bioinformatisch mit Hilfe der Programme MyHits und Motifscan von ch.EMBnet.org des „Swiss Institute of Bioinformatics“ (Schweiz) analysiert. Neben den beiden potentiellen membranspannenden Domänen (Abb. 13) konnten keine weiteren funktionellen Domänen identifiziert werden. Jedoch wurden verschiedener Sequenzmotive gefunden (Tab. 14). So wurden für die Sequenz von NleA₄₇₉₅ neun N-Myristoylationsstellen, drei N-Glykosylierungsstellen, zwei Kasein Kinase II Phosphorylierungsstellen und jeweils eine Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle, Amidierungsstelle bzw. C-terminale Mikrokörperchen-Zielsequenz ermittelt (Tab.14).

Tabelle 14: Sequenzmotive von NleA₄₇₉₅.

Motiv	Position	Sequenz
N-Myristoylationsstellen	37-42	GCeaGF
	71-76	GLIsGL
	122-127	GVqmNI
	201-206	GTsaTT
	285-290	GLefGA
	315-320	GAagGF
	337-342	GSmaGQ
	341-346	GQaIGH
	365-370	GTtIGL
N-Glykosylierungsstellen	101-104	NVTQ
	169-172	NIST
	259-262	NYTE
Kasein Kinase II Phosphorylierungsstellen	74-77	SgID
	409-412	TgaD
Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle	118-120	SgK
Amidierungsstelle	89-92	iGKK
C-terminale Mikrokörperchen-Zielsequenz	457-459	TRV

5. Diskussion

Die zunehmende Anzahl der Sequenzdaten von Genomen Stx-konvertierender Bakteriophagen zeigt ein heterogenes Bild für diese Phagengruppe. Neben der Lokalisation der *stx*-Gene stromabwärts des Antiterminatorgens *Q* weisen diese Phagen zum einen eine konservierte lambdoide genetische Struktur auf, andererseits variiert ihr mosaikartiges Genom in Bezug auf Größe, Genanzahl und Genzusammensetzung (Unkmeir und Schmidt, 2000; Johansen *et al.*, 2001; Recktenwald und Schmidt, 2002; Brüssow *et al.*, 2004).

Durch die Vervollständigung bzw. Überarbeitung der Genomsequenzen der Stx1-Phagen CP-1639 des *E. coli* O111:H⁻ Stammes 1639/77 und BP-4795 des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97 konnten weitere Erkenntnisse zur Heterogenität dieser Gruppe von Bakteriophagen gewonnen werden. Während es sich bei BP-4795 um einen induzierbaren Phagen handelt, liegt CP-1639 als kryptischer Prophage im Bakteriengenom vor. Sie zeigen beide den lambdoiden Aufbau mit der typischen Abfolge der Gene für Rekombination, frühe Regulation, Immunität, Replikation, späte Regulation, Lyse und Morphogenese (Abb. 3). Aufgrund genetischer Rearrangements weist das Genom von CP-1639 kein Integrasegen mehr auf. Darüber hinaus fehlen weitere essentielle Gene zur Rekombination, frühen Regulation und Immunität. Stromabwärts der *stx*-Gene ist lediglich das Gen der Endopeptidase *Rz* der Lysekassette vorhanden. Vermutlich ist der Phage CP-1639 aufgrund dieser massiven Deletionen nicht mehr in der Lage den lytischen Lebenszyklus einzuschlagen. Außerdem kann auch die Unterbrechung des Leserahmens des Schwanzfasergens *U* durch ein IS629-Element zum Verlust der Fähigkeit zur Bildung intakter Phagenpartikel beitragen.

Beide charakterisierte Phagen Genome tragen die genetische Information zur Bildung von Stx1 stromabwärts des Antiterminatorgens *Q*, so dass dessen Regulation vermutlich der generellen Phagenreplikation unterliegt (Wagner und Waldor, 2002). Während bei BP-4795 die zur Aktivierung von *Q* notwendigen Gene *cl* und *N* vorhanden sind, fehlen diese bei CP-1639. Die genaue Regulation des Gens *Q* für diesen Phagen ist ungeklärt. Eventuell tragen die Genprodukte weiterer im *E. coli* Genom lysogen vorliegender Prophagen zur Regulation von *Q* bei.

Das Genom des Phagen BP-4795 umfasst 57930 bp. Im Vergleich dazu besitzen der Stx1-konvertierende Phage VT1-Sakai des *E. coli* O157:H7 Stammes RIMD 0509952

(Yokoyama *et al.*, 2000) und der Stx2-Phage 933W des *E. coli* O157:H7 Stammes EDL933 (Plunkett, III *et al.*, 1999) eine Genomgröße von 47900 bp bzw. 61670 bp. Diese Unterschiede treten vor allem durch eine unterschiedliche Genzusammensetzung in den Bereichen zwischen den Genen *xis* und *exo*, sowie *N* und *cl*, und ferner *ren* und *roi* auf. Des weiteren variiert häufig die Länge der einzelnen Gene der Morphogeneseregion im Vergleich verschiedener Stx-Phagen untereinander. Darüber hinaus weisen die einzelnen Regionen dieser Phagen hohe Ähnlichkeiten zu bestimmten Bereichen verschiedener ebenfalls Stx-konvertierender Bakteriophagen auf. Dies verleiht ihnen ein mosaikartiges genetisches Erscheinungsbild. So gleicht das Genom von BP-4795, mit Ausnahme der Morphogeneseregion, zu großen Teilen dem des Phagen 933W (Plunkett, III *et al.*, 1999). Neben *stx*₁ kommen außerdem einzelne Gene mit Ähnlichkeiten zu Genen von Stx1-Phagen vor. Die Gene der Morphogeneseregion weisen hohe Homologien zu Genen der vergleichbaren Region kryptischer Bakteriophagen, die im Genom des *E. coli* Stammes EDL933 vorliegen, auf. Einen ähnlichen Fall stellt der Stx1-konvertierende Bakteriophage Stx1Φ dar, dessen Genom gleichermaßen höhere Sequenzidentitäten zu Stx2-Phagen als zu Stx1-konvertierenden Phagen aufweist (Sato *et al.*, 2003). Das Genom des Phagen λ umfasst 48502 bp (Sanger *et al.*, 1982), was in etwa der Größe verschiedener Stx-Phagen, wie VT1-Sakai, entspricht. Dagegen ist das mit etwa 39445 bp berechnete Genom von CP-1639, insbesondere durch den Verlust großer Bereiche stromaufwärts der Replikationsregion, verkürzt. Andere induzierbare Stx-konvertierende Phagen weisen ein größeres Genom auf. So besitzen BP-4795 oder auch der Phage 933W ca. 10000-13000 zusätzliche Basenpaare. Beide Phagen tragen vor allem stromabwärts der Morphogeneseregion weitere Gene (Abb. 3) (Plunkett, III *et al.*, 1999). Bei ihnen handelt es sich wahrscheinlich um Morons bakteriellen Ursprungs. Diese Gene besitzen einen eigenen Promotor und Terminator und können daher unabhängig von Genen des Phagengenoms transkribiert werden (Hendrix *et al.*, 2000). BP-4795 weist in diesem Bereich neben vier offenen Leserahmen zwei IS629-Elemente und den ORF eines unbekannten Gens eines ISEc8-Elementes auf. Die Integration fremder Gene in das Phagengenom kann zum einen infolge der unkorrekten Exzision der DNA bei der Replikation des Phagen während des lytischen Lebenszyklus erfolgen. Zum anderen ist der Einbau von Fremd-DNA durch die Aufnahme IS-Element assoziierter Gene möglich. Im Gegensatz zu BP-4795 wird der Bereich des Genoms des Prophagen CP-1639 der normalerweise die Regionen der

Rekombination, frühen Regulation und Immunität beinhaltet von zwei IS629-Elementen begrenzt. Dieser Teil des Phagengenoms von CP-1639 besteht darüber hinaus aus offenen Leserahmen, die hohe Sequenzidentitäten zu Genen verschiedener Phagen aufweisen. Daher könnten einzelne Gene ebenfalls mit Hilfe der IS-Elemente in das Genom dieses Phagen gelangt sein. Als Konsequenz deutet das Erscheinungsbild dieser Region von CP-1639 auf mehrmals aufgetretene genetische Rearrangements hin. Beide analysierte Phagengenome tragen weiterhin am Ende der Morphogeneseregion das Moron *lom*, das für ein äußeres Membranprotein kodiert und innerhalb bisher charakterisierter Stx-Phagen weit verbreitet ist. Darüber hinaus schließen die Genome beider Phagen mit dem Gen *dinI* ab, ein Moron, das auch bei *S. flexneri* zu finden ist. DinI ist an der bakteriellen SOS-Anwort beteiligt, da es die Koprotease- und Rekombinaseaktivität von RecA, ein für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortliches Protein, inhibiert (Yasuda *et al.*, 1998). *dinI* ist ebenfalls in der Sequenz von VT1-Sakai zu finden (Yokoyama *et al.*, 2000). Aus diesem Grund kann spekuliert werden, dass weit verbreitete Morons evolutionär früher in das Phagengenom integriert wurden und Fremd-DNA stromaufwärts von *dinI* zu einem späteren Zeitpunkt der Evolution aufgenommen wurde. So weist die Genkonstellation des Moron-tragenden Sequenzendes von BP-4795 zum einen keine vollständige Übereinstimmung zu anderen in der Datenbank des NCBI hinterlegten Phagensequenzen auf. Des weiteren würde die Integration der mehrheitlich T3SS-assoziierten Leserahmen stromaufwärts von *dinI* des Phagen BP-4795 eher für eine IS-Element-vermittelte Akquisition dieser Gene sprechen. Dagegen ist der genaue Ursprung, sowie die evolutionäre Abfolge der Aufnahme dieser mittels horizontalem Gentransfer akquirierten Morons unbekannt. So gleicht das ORF 80-kodierte potentielle Protein zu 82% einem hypothetischen Protein, das in der Region einer LEE-tragenden Pathogenitätsinsel des *E. coli* O103:H2 Stammes RW1374 stromaufwärts von *espG* und *ler* kodiert wird (Jores *et al.*, 2005). In geringerem Maße von ca. 37% weist die abgeleitete Aminosäuresequenz dieses ORFs eine Übereinstimmung zu OspB auf, einem Virulenzplasmid-assoziiertem Protein unbekannter Funktion von *Shigella* spp., das mit Hilfe des Mxi-Spa Typ III Sekretionssystems transloziert wird (Blocker *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2002). Während ORF 83 ein Phagen-assoziiertes Typ III Effektorprotein von *E. coli* und *C. rodentium* kodiert, auf welches an anderer Stelle noch genauer eingegangen wird, gleicht die abgeleitete Aminosäuresequenz des ORF 84 zu 37% dem Avirulenzprotein AvrA von *P. syringae* (Napoli und Staskawicz,

1987). Der Ausdruck Avirulenz beschreibt in diesem Zusammenhang die Unfähigkeit eines potentiell virulenten Bakteriums Krankheitssymptome bei einer befallenen Wirtspflanze auszulösen. Dafür muss die betroffene Pflanze allerdings ein korrespondierendes Resistenzgen *R* tragen (Bonas und Van den Ackerveken, 1997). Die genaue Funktion dieser Avirulenzproteine ist unbekannt. In einigen Fällen scheinen sie jedoch eine Rolle für die Fitness pathogener Bakterien zu spielen (Bonas und Van den Ackerveken, 1997).

Die Integrationsstellen der Phagen BP-4795 und CP-1639 konnten innerhalb der Gensequenzen von *yehV* bzw. *ssrA* ermittelt werden. Das Gen *yehV*, oder auch *mlrA*, kodiert für den “MerR-like Regulator A“, der die Produktion von dünnen, aggregativen Fimbrien, sogenannten Curli, und die Bildung der extrazellulären Matrix bei *E. coli* und *S. typhimurium* positiv reguliert. Diese Curli gelten als ein Virulenzfaktor dieser Bakterien, da sie die Adhärenz an eukaryotische Wirtszellen verstärken (Brown *et al.*, 2001). Aufgrund der Integration des Phagen BP-4795 an diesem Ort im Genom des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97 könnte die Funktion des Gens *yehV/mlrA* zerstört sein, und dieses Isolat nicht mehr in der Lage sein derartige Curli auszubilden. Dies könnte zum einen zu einer Abschwächung der Virulenz führen, zum anderen besitzen *E. coli* weitere Arten von Fimbrien und Adhäsinen, so dass diese die Adhärenz an das Epithelium des Gastrointestinaltraktes vermitteln können. Bei dem Gen *ssrA* handelt es sich hingegen um eine tmRNA. Diese ist mit ihrer tRNA-Funktion am Transfer gebundener Aminosäuremoleküle zur Proteinbildung an den Ribosomen beteiligt. Mit der Eigenschaft als mRNA spielt *ssrA* eine Rolle beim Schutz der Ribosomen vor Fehlfunktionen (Williams, 2003). Laut Williams (2003) können bei verschiedenen Arten der *Enterobacteriaceae* unterschiedliche genetische Elemente in das Gen *ssrA* integrieren. So gehört auch das verkürzte Integrasegen *intA*, des integrativen Elementes in der unmittelbaren Umgebung von CP-1639, zu der P4-Integrase-Familie, deren Mitglieder in die Sequenz von *ssrA* integrieren. *ssrA* weist verschiedene Erkennungssequenzen auf und diese sind zum Teil nach der Integration bestimmter Integrasen weiterhin vorhanden (Williams, 2003). Daher ist der Einbau des integrativen Elementes und des Phagen CP-1639 im Gen *ssrA* des *E. coli* Genoms möglich. Welche dieser genetischen Einheiten evolutionär früher in das Genom des Stammes 1639/77 aufgenommen wurde, ist ungeklärt. Weiterhin scheint das Gen *ssrA* intakt zu sein, da die kurzen Erkennungssequenzen am 3'-Ende dieser tmRNA lokalisiert sind und somit für den *E. coli* O111:H⁻ Stamm 1639/77

ein vollständiges Gen, ohne Mutationen mit Hilfe der DNA-Sequenzierung detektiert wurde.

Aufgrund der geringen Anzahl gegenwärtig vollständig sequenzierter STEC-Genome, wurden in der Literatur keine weiteren Berichte zum Auftreten eines integrativen Elementes oder Leserahmen unbekannter Herkunft in der unmittelbaren Umgebung von Stx-konvertierenden Bakteriophagen gefunden. Des weiteren konnte das integrative Element nicht bei allen untersuchten Serotypen nachgewiesen werden. So kommt es wahrscheinlich bei *E. coli* O145:H⁻ und O157:H7 Stämmen nicht vor. Dagegen scheinen verschiedene Isolate des Serotyps O157:H⁻ nur ein verkürztes oder anders aufgebautes integratives Element im Genom innerhalb des Gens *ssrA* zu tragen. Da mit Hilfe der verwendeten PCR-Systeme nur die Abfolge der einzelnen Gene innerhalb des integrativen Elementes und der Übergang zu einem IS629-Element untersucht wurde, kann das gleichzeitige Vorkommen dieses Elementes und eines Stx-Phagen im Genom von *E. coli* Stämmen des Serotyps O111:H⁻ nur vermutet werden (Abb. 5). Fünf der sechs untersuchten O111:H⁻ Isolate zeigten gleiche PCR-Ergebnisse wie der CP-1639 tragende Stamm 1639/77, so dass sie wahrscheinlich dieses Element in Verbindung mit einem kryptischen Stx1-konvertierenden Phagen tragen. Eine Ausnahme bildet der *E. coli* O111:H⁻ Stamm 4556/99, der zwar das integrative Element im Anschluss an das Gen *b2657* trägt, aber der Integrationsort des Gens *intA* nicht bestimmt werden konnte (Abb. 5, Tab. 9). Neben der methodischen Unzulänglichkeit, dass Sequenzunterschiede eine ausreichende Bindung der verwendeten Oligonukleotide verhinderten, besteht die Möglichkeit des Auftretens des integrativen Elementes in Verbindung mit einem Bakteriophagen, der an dieser Stelle kein IS-Element trägt. Weiterhin wäre eine, zumindest teilweise, Deletion des Gens *ssrA* oder die Integration anderer Fremd-DNA im Anschluss an das Gen *intA* denkbar. Ein derartiges Ergebnis wurde ebenfalls für das *E. coli* O103:H2 Isolat 5714/96 und den O103:H18 Stamm 1909/97 erhalten. Aus diesem Grund könnten auch sie ein integratives Element in Assoziation mit einem Phagen tragen, der allerdings eine von CP-1639 abweichende Sequenz aufweisen müsste. Da bei den weiteren elf untersuchten Isolaten der Serogruppe O103 das integrative Element ohne weitere Fremd-DNA im Gen *ssrA* integriert vorkommt, ist das Auftreten von Mutationen wahrscheinlicher, die einen Nachweis mit dem verwendeten PCR-System unmöglich machten. Für diese O103 Stämme wurden bei einzelnen Genen PCR-Produkte mit Abweichungen von der erwarteten Größe oder kein Produkt er-

halten. Dies war vor allem bei der PCR zum Nachweis des Überganges des Gens *b2657* und des ersten Gens des integrativen Elementes ORF 5 durch die Integration eines IS-Elementes der Fall. Den ermittelten Genotyp der Mehrheit der O103 Stämme zeigten auch die meisten Isolate der Serotypen O15:H⁻, O26:H⁻ und O128:H2 (Tab. 9). Die Ergebnisse der PCR-Analyse zeigen zum einen die Verbreitung des integrativen Elementes in einigen Serotypen. Da die Funktion der innerhalb dieses Elementes kodierten Proteine unbekannt ist, kann keine Aussage über einen eventuell bestehen Vorteil bei Anwesenheit des integrativen Elementes im Genom verschiedener *E. coli* Stämme getroffen werden. Des weiteren weist das unterschiedliche Aussehen des Elementes auf eine Region hin, die in der Evolution von Rekombinationsereignissen betroffen war. Jedoch kann auch über die Frage, ob das integrative Element den bereits im Genom des Stammes 1639/77 integrierten Phagen CP-1639 zerstört hat, nur spekuliert werden.

Die Lokalisation des Typ III Effektorprotein kodierenden Gens *nleA*₄₇₉₅ im Genom eines Stx1-konvertierenden Phagen zeigt die Bedeutung von Bakteriophagen bei dem horizontalen Gentransfer von Virulenzfaktoren. Die Gene für T3SS Effektoren im Genom lambdoider Bakteriophagen sind typischerweise stromabwärts der Schwanz-fasergene lokalisiert. Darüber hinaus trägt jeder dieser Phagen die genetische Information mehrerer T3SS Effektorproteine, die sich auf eine Anzahl von acht Genen belaufen kann (Tobe *et al.*, 2006). So kommt die *nleA*-Variante *espl-like* stromabwärts des Gens *cif* am Ende eines Phagen des enteropathogenen *E. coli* O103:H2 Stammes E22 vor (Marchés *et al.*, 2003). Auch *nleA*₄₇₉₅ des Phagen BP-4795 ist stromabwärts der Schwanzfasergene in einer Region weiterer T3SS-assoziiierter Gene lokalisiert. Diese Lokalisation von T3SS Effektor-kodierenden Genen weist zum einen auf eine Akquisition und zum anderen auf eine Verbreitung durch horizontalen Gentransfer mit Hilfe lambdoider Phagen hin. Die durchgeführten Experimente zur Transduktion *nleA*-tragender Bakteriophagen verschiedener *E. coli* Stämme zeigen die Möglichkeit sowohl Varianten des Gens *nleA* als auch *stx* auf einen *E. coli* Laborstamm zu übertragen. In der Umwelt sollte dieser Gentransfer ebenfalls zwischen verschiedenen Stämmen pathogener *E. coli* oder auch verschiedener Arten der *Enterobacteriaceae* möglich sein, sofern diese nicht bereits immun gegen die Infektion des betreffenden Phagen sind. Dies kann zur Entstehung neuer Krankheitserreger führen, die schwerwiegende Krankheitssymptome auslösen, wie

es im Falle der EHEC aufgetreten ist. Da die genaue Funktion der Virulenzdeterminante NleA bisher unbekannt ist, kann keine Aussage getroffen werden, welche Auswirkungen der horizontale Gentransfer dieses T3SS Effektorproteins auf die Entstehung neuer Pathogene hat, sowie ob und welche weiteren Proteine für die Funktion von NleA notwendig sind. Der Phage BP-4795 ist jedoch ein Beispiel, dass mit Hilfe dieser mobilen genetischen Elemente unterschiedliche Virulenzfaktoren verbreitet werden können. So schlussfolgerten auch Tobe *et al.* (2006), dass die Typ III Sekretion von *E. coli* mit einem riesigen, für die Evolution von Virulenzfaktoren bedeutenden Phagen-„Metagenom“ in Zusammenhang steht.

Während verschiedene Gene, wie *stx*, *hopW*, *ospG* oder *avrA* Ähnlichkeiten zu Genen anderer *Enterobacteriaceae* aufweisen und eventuell ursprünglich aus deren Genomen stammen, konnte bei einem Datenbankabgleich für *nleA*₄₇₉₅ außer *C. rodentium* keine weitere Bakterienart neben STEC und EPEC identifiziert werden, die diesen Effektor exprimiert. Sofern das entsprechende Gen nicht im Genom eines bisher uncharakterisierten Bakteriums vorliegt, scheint sein Vorkommen sehr artspezifisch zu sein. Daher ist die Funktion dieses Effektorproteins eventuell nur für die Virulenz von *E. coli* bzw. *C. rodentium* von Bedeutung.

Gruenheid *et al.* (2004) konnten in einem Mausmodell unter Verwendung von *C. rodentium* die Bedeutung von NleA als Virulenzdeterminante zeigen. *C. rodentium* wird häufig als Modellorganismus zur Simulation der Pathogenesemechanismen von A/E-Läsionen vermittelnden STEC und EPEC genutzt, da für diese *E. coli* derzeit kein relevantes Tiermodell zur Verfügung steht. Während alle mit einem Wildtyp-Stamm infizierten Mäuse innerhalb von zehn Tagen starben, traten bei Mäusen, die mit einer $\Delta nleA$ -Deletionsmutante von *C. rodentium* infiziert wurden, nur leichte Krankheitssymptome auf. Dagegen führte die Expression von NleA auf einem Plasmid mit geringer Kopienzahl in einer $\Delta nleA$ -Deletionsmutante bei infizierten Mäusen innerhalb von dreizehn Tagen zum Tod. Weiterhin zeigte die erneute Infektion der Mäuse, die zuvor der $\Delta nleA$ -Deletionsmutante ausgesetzt waren, mit dem Wildtyp-Stamm eine Resistenzentwicklung gegen diesen *C. rodentium* Stamm. Gruenheid *et al.* (2004) schlussfolgerten, dass die abgeschwächte Mutante noch in der Lage ist, die Immunantwort des Wirtes zu stimulieren.

Innerhalb eukaryotischer HeLa-Zellen konnte die Lokalisation von NleA₄₇₉₅ im Trans-Golgi Netzwerk nachgewiesen werden. Eine derartige Lokalisation wurde ebenfalls von Gruenheid *et al.* (2004) beschrieben. Die Sequenz von NleA₄₇₉₅ weist zwei po-

tentielle membranspannende Domänen auf (Abb. 13), wodurch eine Einlagerung in Membranen des Golgi-Apparates zu vermuten wäre. Aufgrund dieses Zielorganells von NleA sind unterschiedliche Funktionen möglich. Der Golgi-Apparat ist für die Modifizierung und die geregelte Sekretion hauptsächlich von Proteinen verantwortlich. So könnte NleA zum einen den Metabolismus der eukaryotischen Zelle beeinträchtigen, indem es die gesamte Funktion des Golgi-Apparates durch die Spaltung eines essentiellen Regulatorproteins unterbindet. Mit Hilfe eines derartigen Mechanismus wirkt das Subtilase Zytotoxin auf das endoplasmatische Retikulum ein (Paton *et al.*, 2006). Weiterhin ist auch ein Einfluss auf eine einzelne Funktion des Golgi-Apparates denkbar. NleA könnte die Modifizierung eines oder verschiedener Proteine unterbinden, die das Überleben des pathogenen Bakteriums erschweren, so dass diese Proteine als nichtfunktionelle Vorstufen in der eukaryotischen Zelle vorliegen. Weiterhin wäre eine Störung der Sekretion bestimmter Proteine möglich. Dies wirkt sich ebenfalls auf verschiedene Zellfunktionen aus. Andererseits könnte NleA auch die Sekretion weiterer bakterieller Virulenzdeterminanten in der eukaryotischen Zelle verstärken, um die Ansiedlung oder das Überleben pathogener *E. coli* zu verbessern. In ähnlicher Art und Weise könnte es auch auf die Konzentration und Lagerung von Proteinen innerhalb des Golgi-Apparates wirken. So wäre zum einen eine Behinderung der Einlagerung und Konzentrierung von Proteinen, andererseits die verstärkte Einlagerung und damit eine zu hohe Konzentration einzelner Proteine denkbar, was wiederum Auswirkungen auf den Zellstoffwechsel hat. Als weiterer Angriffspunkt wäre die Sortierung von Proteinen im Trans-Golgi Netzwerk möglich. So könnten Proteine fehlgeleitet werden und ihre zuge dachte Aufgabe nicht mehr erfüllen oder für das Bakterium vorteilhafte Proteine gezielt zu ihren Zielorganellen transportiert werden.

E. coli Stämme mit defektem T3SS scheinen NleA₄₇₉₅ in geringeren Mengen zu exprimieren (Kapitel 4.2.4). Dies wirft die Frage einer gekoppelten Expression LEE-kodierter und nicht LEE-kodierter Gene auf. Eventuell besitzen diese Bakterien einen Kontrollmechanismus, der die Bildung von Typ III Effektorproteinen in größerem Umfang nur bei der Anwesenheit eines intakten T3SS erlaubt.

Die bioinformatische Analyse von NleA₄₇₉₅ führte lediglich zur Identifizierung verschiedener Sequenzmotive (Tab.14). Eine Zielsequenz für den Transport zum Golgi-Apparat wurde nicht gefunden. Innerhalb der Proteinsequenz sind N-Myristoylationsstellen, N-Glykosylierungsstellen, Kasein Kinase II Phosphorylierungsstellen, eine

Proteinkinase C Phosphorylierungsstelle und Amidierungsstelle vorhanden. Bei diesen Motiven handelt es sich allerdings um oft vorkommende Erkennungssequenzen für unterschiedliche Enzyme, die für die Modifizierung von Proteinen verantwortlich sind. Weiterhin wurde eine C-terminale Mikrokörperchen-Zielsequenz detektiert. Zur Gruppe der zellulären Mikrokörperchen zählen Peroxisomen, Glyoxysomen und Glykosomen. Diese Zielsequenz ist ein ebenfalls häufig auftretendes Motiv. Somit, kann anhand dieser Motive keine mögliche Funktion für NleA₄₇₉₅ abgeleitet werden. Bisher ist auch ungeklärt, ob eines oder mehrere dieser Motive für die Funktionalität dieses Proteins notwendig sind.

Die unterschiedlichen *nleA*-Varianten sind, vor allem bei Serogruppen, die mit schwerwiegenderen Krankheitssymptomen bei einer *E. coli* Infektion assoziiert sind, weit verbreitet (Tab. 12). Dies deutet auf eine Funktion des kodierten Typ III Effektorproteins in der Pathogenese und einen evolutionären Vorteil dieser Bakterien hin. Allerdings weisen sowohl die untersuchten Gen- als auch die abgeleiteten Aminosäuresequenzen zum Teil eine Vielzahl von Mutationen auf, die über die gesamte Sequenz verteilt sind. Dies führte zur Entstehung verschiedener Varianten der NleA-Familie, die bisher vierzehn bekannte Vertreter umfasst. Allerdings könnte deren Anzahl noch steigen, da bei *E. coli* Stämmen in dieser Arbeit nicht untersuchter Serogruppen vermutlich weitere Unterschiede auftreten. Da derzeit keine für die Funktionalität essentiellen Motive der abgeleiteten Aminosäuresequenz bekannt sind, kann eine Aussage über die Auswirkungen der einzelnen Punktmutationen auf die Funktion von NleA nicht getroffen werden. Jedoch ist es wahrscheinlich, dass diese Mutationen meist keine essentiellen Motive betreffen, da große Teile der Sequenz konserviert sind. Des weiteren gleicht sich in vielen Fällen der Austausch einzelner Aminosäuren bei verschiedenen Vertretern der NleA-Familie (Abb. 13). Allerdings deutet das Vorkommen der vielen Varianten auf ein Gen hin, das von wiederholten Rekombinationsereignissen betroffen war und sicherlich immer noch ist. Dies könnte mit der Lokalisation am Ende eines Phagengenomes in Zusammenhang stehen. Die Assoziation von *nleA* mit einem Phagen ist zwar bisher nur für sieben der 149 in dieser Arbeit charakterisierten *nleA*-positiven *E. coli* Stämme experimentell bestätigt. Jedoch ist die Wahrscheinlichkeit dieser Lokalisation relativ hoch. Die Region stromabwärts der Schwanzfasergene induzierbarer, sowie kryptischer Bakteriophagen scheint häufigen genetischen Rearrangements unterworfen zu sein, deren

Ursachen bereits an anderer Stelle dieser Diskussion beschrieben wurden. Außerdem zeigen die Ergebnisse der Southern-Blot Hybridisierung zumeist ein gleichartiges Erscheinungsbild bei jeder Serogruppe, oder zum Teil auf der Ebene des Serotyps, so dass auf eine einheitliche Lokalisation von Genen der NleA-Familie im Bakteriengenom bestimmter Serotypen geschlossen werden kann, von wenigen Ausnahmen abgesehen.

Tobe *et al.* (2006) beschrieben das mehrmalige Vorkommen einzelner Vertreter der über 20 identifizierten Typ III Effektor-Familien im Genom des *E. coli* O157:H7 Stammes RIMD 0509952. So waren sie in der Lage für die umfangreichste Gruppe 14 Vertreter zu detektieren. Im Gegensatz zu *E. coli* O157 Stämmen treten im Genom von Isolaten anderer Serogruppen wie O26, O84 und O156 zwei meist verschiedene Kopien von *nleA* auf. Dies weist zum einen auf das häufige Vorkommen dieses Gens und zum anderen auf eine Verbreitung mittels horizontalem Gentransfer hin. Bei der Mehrzahl der entsprechenden Isolate ist der offene Leserahmen einer Kopie, aufgrund der Deletion eines einzelnen Basenpaares oder der Insertion eines IS-Elementes, verkürzt. Dies könnte ebenfalls für eine Immobilisierung des genetischen Elementes sprechen, als deren Konsequenz das betroffene Bakterium für eine erneute Infektion mit einem weiteren *nleA*-tragenden Phagen anfällig war.

Die einzelnen Serogruppen der *E. coli* Stämme weisen ein recht einheitliches Bild in Bezug auf die auftretende *nleA*-Variante auf. Dies gilt insbesondere für Serogruppen, die mit schwerwiegenderen Krankheitssymptomen assoziiert werden. Dagegen variieren die *nleA*-Varianten bei Isolaten der anderen Serogruppen in einem höheren Maß. Dies deutet auf eine gewisse Konservierung dieses Gens bei pathogenen Stämmen hin. Dagegen scheinen die kodierenden Gene von Vertretern der NleA-Familie bei verschiedenen Serogruppen in größerem Umfang immer wieder auftretenden Rekombinationsereignissen unterworfen zu sein, was sich in einer Vielzahl von Variationen äußert. Somit könnten diese Varianten eine Art genetischen Pool darstellen, der zur Ausbildung und Verbreitung unterschiedlicher Varianten dieses Typ III Effektor-proteins dient, wobei ungeklärt ist, ob eine bestimmte Variante einen Selektionsvorteil bietet.

Es besteht auch die Möglichkeit einer Anpassung der einzelnen NleA-Varianten an verschiedene Zielstrukturen im Gastrointestinaltrakt des eukaryotischen Wirtes, wie es für Intimin der Fall ist (Fitzhenry *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2002b). Ebenfalls denkbar wäre eine Assoziation einer bestimmten Variante mit dem Auftreten

schwerwiegender Krankheitssymptome, wie es für Stx2-exprimierende *E. coli* Stämme beschrieben wurde (Boerlin *et al.*, 1999; Friedrich *et al.*, 2002). Dagegen würde allerdings die Detektion insgesamt sieben unterschiedlicher Varianten des Gens *nleA* bei *E. coli* Isolaten, die von Patienten einer HUS-Erkrankung stammen, sprechen. Jedoch konnte das Gen bei allen humanen Isolaten detektiert werden, die mit schwerwiegenderen Krankheitssymptomen assoziiert waren. Eine derartige Assoziation zwischen dem Auftreten von *nleA* und der Schwere des Krankheitsverlaufes einer *E. coli* Infektion postulierten Mundy *et al.* (2004a). Da die eventuell hervorgerufenen Krankheitssymptome für etwa ein Viertel der untersuchten 170 pathogenen *E. coli* Stämme unbekannt ist und das Gen *nleA* ebenfalls bei fast allen Isolaten von asymptomatischen Trägern nachgewiesen wurde, kann eine dementsprechende Aussage infolge dieser Untersuchung nicht getroffen werden. Weiterhin konnte keine vorherrschende Kombination von *nleA*- und *stx*-Varianten, sowie *eae*-Subtypen festgestellt werden. Mundy *et al.* (2004a) assoziierten das Vorkommen des Gens *nleA* mit bestimmten *eae*-Subtypen. Aufgrund der weiten Verbreitung von *nleA* konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Varianten dieser Gene bestätigt werden. Vielmehr scheint eine Assoziation des Auftretens der *nleA*-Varianten mit bestimmten Serogruppen bzw. Serotypen gegeben zu sein. Anhand dieser Daten wäre daher die Erstellung von Dendrogrammen zur Aufklärung von Verwandtschaftsbeziehungen der Serogruppen untereinander möglich. Außerdem könnten die Sequenzdaten des Gens *nleA* zur Entwicklung diagnostischer Verfahren herangezogen werden. Dafür wäre jedoch die vorherige Aufklärung der Funktion sinnvoll, um den Nutzen eines derartigen Verfahrens beurteilen zu können.

Darüber hinaus wurden für *nleA*-tragende Stämme, die in der Humanmedizin eine wichtige Rolle spielen, verkürzte Varianten ermittelt. Im Gegensatz dazu treten die längsten Varianten des Gens *nleA* bei den Serogruppen O84 und O156 auf, die durch eine Vervielfachung einzelner Aminosäuren in der vorderen Hälfte der abgeleiteten Aminosäuresequenz zustande kommen (Abb. 13, Kapitel 4.2.1). Eine Variation der Länge wurde ebenfalls bei dem Typ III Effektorprotein-kodierenden Gen *tccP* festgestellt. Diese treten infolge einer variierenden Anzahl Prolin-reicher Wiederholungen auf (Garmendia *et al.*, 2005b). Evolutionär können diese Varianten zum einen durch ein wiederholte Insertion der betreffenden Aminosäuren entstanden sein, zum anderen kann die Deletion dieser Region des Proteins verkürzte Varianten hervorgebracht haben. Das Fehlen der kompletten Region bei Varianten von *nleA*

geht mit dem Verlust einer potentiellen membranspannenden Domäne einher. Ob die Anzahl dieser möglichen Domänen die Membranintegrität und dementsprechend die Funktion des Typ III Effektorproteins beeinflusst, wurde bislang nicht geklärt.

Die Charakterisierung des Typ III Effektorproteins NleA₄₇₉₅ hat auch neue Fragen aufgeworfen. Zum einen ist die genaue Funktion dieses Proteins in der Pathogenese von *E. coli* nach wie vor unbekannt. Die Sequenzdaten können erste Anhaltspunkte für eine gezielte Untersuchung konservierter Bereiche des Proteins zur Identifizierung wichtiger Motive oder Domänen liefern und somit zur Funktionsaufklärung von NleA beitragen. Die Funktionalität einzelner Varianten des Gens *nleA* konnte ebenfalls nicht geklärt werden. Dies wäre insbesondere für die beiden Isolate S21195 und 1187/00, deren Genom keinen LEE aufweist, interessant. Eventuell besitzen diese beiden Stämme ein alternatives Transportsystem zur Sekretion dieses Proteins. Andererseits kann es sich auch um ein Protein handeln, das aufgrund evolutionärer genetischer Umordnungen keine Funktion mehr besitzt. Dies würde auch die Frage der Koevolution des T3SS und von Typ III Effektoren, die außerhalb des LEE kodiert werden, aufwerfen. Weiterhin wäre die genaue Lokalisation der einzelnen *nleA*-Varianten im Genom von *E. coli* zu klären, da die Charakterisierung der flankierenden Bereiche unter anderem zur Identifizierung bisher unbekannter Typ III Effektoren führen könnte. Interessant wäre ebenfalls der zeitliche Verlauf der NleA-Expression nach der Anheftung von *E. coli* an das Darmepithel, um den Pathogenitätsmechanismus von EHEC und EPEC besser verstehen zu können. Somit besteht weiterer Forschungsbedarf auf dem Gebiet der NleA-Familie.

6. Literaturverzeichnis

Abe,H., Tatsuno,I., Tobe,T., Okutani,A., and Sasakawa,C. (2002). Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 70: 3500-3509.

Ackers,M.L., Mahon,B.E., Leahy,E., Goode,B., Damrow,T., Hayes,P.S., Bibb,W.F., Rice,D.H., Barrett,T.J., Hutwagner,L., Griffin,P.M., and Slutsker,L. (1998). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with leaf lettuce consumption. J Infect Dis 177: 1588-1593.

Alam,M.J., and Zurek,L. (2004). Association of *Escherichia coli* O157:H7 with houseflies on a cattle farm. Appl Environ Microbiol 70: 7578-7580.

Allerberger,F., Friedrich,A.W., Grif,K., Dierich,M.P., Dornbusch,H.J., Mache,C.J., Nachbaur,E., Freilinger,M., Rieck,P., Wagner,M., Caprioli,A., Karch,H., and Zimmerhackl,L.B. (2003). Hemolytic-uremic syndrome associated with enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H infection and consumption of unpasteurized cow's milk. Int J Infect Dis 7: 42-45.

Altting-Mees,M.A., and Short,J.M. (1989). pBluescript II: gene mapping vectors. Nucleic Acids Res 17: 9494.

Appleyard,R.K. (1954). Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. Genetics 39: 440-452.

Armstrong,G.D., Mulvey,G.L., Marcato,P., Griener,T.P., Kahan,M.C., Tennent,G.A., Sabin,C.A., Chart,H., and Pepys,M.B. (2006). Human serum amyloid P component protects against *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxin 2 in vivo: therapeutic implications for hemolytic-uremic syndrome. J Infect Dis 193: 1120-1124.

Barba,J., Bustamante,V.H., Flores-Valdez,M.A., Deng,W., Finlay,B.B., and Puente,J.I. (2005). A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. J Bacteriol 187: 7918-7930.

- Bell,B.P., Goldoft,M., Griffin,P.M., Davis,M.A., Gordon,D.C., Tarr,P.I., Bartleson,C.A., Lewis,J.H., Barrett,T.J., Wells,J.G., Baron,R., and Kobayashi,J. (1994). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience. JAMA 272: 1349-1353.
- Belongia,E.A., Osterholm,M.T., Soler,J.T., Ammend,D.A., Braun,J.E., and MacDonald,K.L. (1993). Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Minnesota child day-care facilities. JAMA 269: 883-888.
- Berdichevsky,T., Friedberg,D., Nadler,C., Rokney,A., Oppenheim,A., and Rosenshine,I. (2005). Ler is a negative autoregulator of the *LEE1* operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 187: 349-357.
- Besbas,N., Karpman,D., Landau,D., Loirat,C., Proesmans,W., Remuzzi,G., Rizzoni,G., Taylor,C.M., Van de Kar,N., and Zimmerhackl,L.B. (2006). A classification of hemolytic uremic syndrome and thrombotic thrombocytopenic purpura and related disorders. Kidney Int 70: 423-431.
- Besser,R.E., Lett,S.M., Weber,J.T., Doyle,M.P., Barrett,T.J., Wells,J.G., and Griffin,P.M. (1993). An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. JAMA 269: 2217-2220.
- Beutin,L., Geier,D., Steinrück,H., Zimmermann,S., and Scheutz,F. (1993). Prevalence and some properties of verotoxin (Shiga-like toxin)-producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. J Clin Microbiol 31: 2483-2488.
- Beutin,L., Krause,G., Zimmermann,S., Kaulfuss,S., and Gleier,K. (2004). Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. J Clin Microbiol 42: 1099-1108.
- Bielaszewska,M., Fell,M., Greune,L., Prager,R., Fruth,A., Tschäpe,H., Schmidt,M.A., and Karch,H. (2004). Characterization of cytolethal distending toxin genes and expression in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains of non-O157 serogroups. Infect Immun 72: 1812-1816.

- Bielaszewska,M., Sinha,B., Kuczius,T., and Karch,H. (2005). Cytolethal distending toxin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 causes irreversible G₂/M arrest, inhibition of proliferation, and death of human endothelial cells. *Infect Immun* 73: 552-562.
- Birnboim,H.C., and Doly,J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Blanco,M., Blanco,J.E., Mora,A., Dahbi,G., Alonso,M.P., González,E.A., Bernárdez, M.I., and Blanco,J. (2004). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (*eae-ξ*). *J Clin Microbiol* 42: 645-651.
- Blocker,A., Jouihri,N., Larquet,E., Gounon,P., Ebel,F., Parsot,C., Sansonetti,P., and Allaoui,A., (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* 'needle complex', a part of its type III secreton. *Mol Microbiol* 39: 652-663.
- Boerlin,P., McEwen,S.A., Boerlin-Petzold,F., Wilson,J.B., Johnson,R.P., and Gyles, C.L. (1999). Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 37: 497-503.
- Bonas,U., and Van den Ackerveken,A.G. (1997). Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: a general phenomenon in resistance to bacterial diseases? *Plant J* 12:1-7.
- Breuer,T., Benkel,D.H., Shapiro,R.L., Hall,W.N., Winnett,M.M., Linn,M.J., Neimann, J., Barrett,T.J., Dietrich,S., Downes,F.P., Toney,D.M., Pearson,J.L., Rolka,H., Slutsker,L., and Griffin,P.M. (2001). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections linked to alfalfa sprouts grown from contaminated seeds. *Emerg Infect Dis* 7: 977-982.
- Brewster,D.H., Brown,M.I., Robertson,D., Houghton,G.L., Bimson,J., and Sharp,J.C. (1994). An outbreak of *Escherichia coli* O157 associated with a children's paddling pool. *Epidemiol Infect* 112: 441-447.
- Brooks,J.T., Sowers,E.G., Wells,J.G., Greene,K.D., Griffin,P.M., Hoekstra,R.M., and Strockbine,N.A. (2005). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002. *J Infect Dis* 192: 1422-1429.

- Brown,P.K., Dozois,C.M., Nickerson,C.A., Zuppardo,A., Terlonge,J., and Curtiss,R., III (2001). MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* 41: 349-363.
- Bruce,M.G., Curtis,M.B., Payne,M.M., Gautam,R.K., Thompson,E.C., Bennett,A.L., and Kobayashi,J.M. (2003). Lake-associated outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 in Clark County, Washington, August 1999. *Arch Pediatr Adolesc Med* 157: 1016-1021.
- Brunder,W., Khan,A.S., Hacker,J., and Karch,H. (2001). Novel type of fimbriae encoded by the large plasmid of sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻. *Infect Immun* 69: 4447-4457.
- Brunder,W., Karch,H., and Schmidt,H. (2006). Complete sequence of the large virulence plasmid pSFO157 of the sorbitol-fermenting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻ strain 3072/96. *Int J Med Microbiol*. 296: 467-474.
- Brunder,W., Schmidt,H., and Karch,H. (1996). KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142: 3305-3315.
- Brunder,W., Schmidt,H., and Karch,H. (1997). EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol Microbiol* 24: 767-778.
- Brüssow,H., Canchaya,C., and Hardt,W.D. (2004). Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 560-602.
- Burk,C., Dietrich,R., Acar,G., Moravek,M., Bülte,M., and Martlbauer,E. (2003). Identification and characterization of a new variant of Shiga toxin 1 in *Escherichia coli* O157:H7 of bovine origin. *J Clin Microbiol* 41: 2106-2112.
- Burland,V., Shao,Y., Perna,N.T., Plunkett,G., Sofia,H.J., and Blattner,F.R. (1998). The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res* 26: 4196-4204.

- Bustamante,V.H., Santana,F.J., Calva,E., and Puente,J.L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. Mol Microbiol 39: 664-678.
- Calderwood,S.B., Acheson,D.W.K., Keusch,G.T., Barett,T.J., Griffin,P.M., Strockbine, N.A., Swaminathan,B., Kaper,J.B., Levine,M.M., Kaplan,B.S., Karch,H., O'Brien,A.D., Obrig,T.G., Takeda,Y., Tarr,P.I., and Wachsmuth,I.K. (1996). Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. ASM News 62: 118-119.
- Calderwood,S.B., and Mekalanos,J.J. (1987). Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. J Bacteriol 169: 4759-4764.
- Campellone,K.G., Robbins,D., and Leong,J.M. (2004). EspF_U is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. Dev Cell 7: 217-228.
- Cantey,J.R., and Blake,R.K. (1977). Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. J Infect Dis 135: 454-462.
- Caprioli,A., Morabito,S., Brugère,H., and Oswald,E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res 36: 289-311.
- Carter,A.O., Borczyk,A.A., Carlson,J.A., Harvey,B., Hockin,J.C., Karmali,M.A., Krishnan,C., Korn,D.A., and Lior,H. (1987). A severe outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 --associated hemorrhagic colitis in a nursing home. N Engl J Med 317: 1496-1500.
- Cebula,T.A., Payne,W.L., and Feng,P. (1995). Simultaneous identification of strains of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and their Shiga-like toxin type by mismatch amplification mutation assay-multiplex PCR. J Clin Microbiol 33: 248-250.
- Ceelen,L.M., Decostere,A., Ducatelle,R., and Haesebrouck,F. (2006). Cytolethal distending toxin generates cell death by inducing a bottleneck in the cell cycle. Microbiol Res 161: 109-120.
- Chalmers,R.M., Salmon,R.L., Willshaw,G.A., Cheasty,T., Looker,N., Davies,I., and Wray,C. (1997). Vero-cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in a farmer handling horses. Lancet 349: 1816.

- Chapman,P.A., Cornell,J., and Green,C. (2000). Infection with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 during a visit to an inner city open farm. *Epidemiol Infect* 125: 531-536.
- Cherla,R.P., Lee,S.Y., and Tesh,V.L. (2003). Shiga toxins and apoptosis. *FEMS Microbiol Lett* 228: 159-166.
- Clarke,S.C., Haigh,R.D., Freestone,P.P.E., and Williams,P.H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 16: 365-378.
- Cobeljic,M., Dimic,B., Opacic,D., Lepsanovic,Z., Stojanovic,V., and Lazic,S. (2005). The prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in domestic animals and food in Serbia. *Epidemiol Infect* 133: 359-366.
- Cody,S.H., Glynn,M.K., Farrar,J.A., Cairns,K.L., Griffin,P.M., Kobayashi,J., Fyfe,M., Hoffman,R., King,A.S., Lewis,J.H., Swaminathan,B., Bryant,R.G., and Vugia,D.J. (1999). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection from unpasteurized commercial apple juice. *Ann Intern Med* 130: 202-209.
- Cornick,N.A., Helgerson,A.F., Mai,V., Ritchie,J.M., and Acheson,D.W. (2006). In vivo transduction of an Stx-encoding phage in ruminants. *Appl Environ Microbiol* 72: 5086-5088.
- Crampin,M., Willshaw,G., Hancock,R., Djuretic,T., Elstob,C., Rouse,A., Cheasty,T., and Stuart,J. (1999). Outbreak of *Escherichia coli* O157 infection associated with a music festival. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 18: 286-288.
- Creuzburg,K., Recktenwald,J., Kuhle,V., Herold,S., Hensel,M., and Schmidt,H. (2005). The Shiga toxin 1-converting bacteriophage BP-4795 encodes an NleA-like type III effector protein. *J Bacteriol* 187: 8494-8498.
- Dahan,S., Wiles,S., La Ragione,R.M., Best,A., Woodward,M.J., Stevens,M.P., Shaw,R.K., Chong,Y., Knutton,S., Phillips,A., and Frankel,G. (2005). EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. *Infect Immun* 73: 679-686.

- Datsenko,K.A., and Wanner,B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6640-6645.
- David,S.T., MacDougall,L., Louie,K., McIntyre,L., Paccagnella,A.M., Schleicher,S., and Hamade,A. (2004). Petting zoo-associated *Escherichia coli* O157:H7--secondary transmission, asymptomatic infection, and prolonged shedding in the classroom. *Can Commun Dis Rep* 30: 173-180.
- Dean,P., Maresca,M., and Kenny,B. (2005). EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol* 8: 28-34.
- Dell'Omo,G., Morabito,S., Quondam,R., Agrimi,U., Ciuchini,F., Macri,A., and Caprioli, A. (1998). Feral pigeons as a source of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Vet Rec* 142: 309-310.
- Deng,W., Li,Y., Hardwidge,P.R., Frey,E.A., Pfuetzner,R.A., Lee,S., Gruenheid,S., Strynakda,N.C.J., Puente,J.L., and Finlay,B.B. (2005). Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun* 73: 2135-2146.
- Deng,W., Puente,J.L., Gruenheid,S., Li,Y., Vallance,B.A., Vazquez,A., Barba,J., Ibarra,J.A., O'Donnell,P., Metalnikov,P., Ashman,K., Lee,S., Goode,D., Pawson,T., and Finlay,B.B. (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 3597-3602.
- Doyle,M.P., and Schoeni,J.L. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl Environ Microbiol* 53: 2394-2396.
- Elliott,S.J., Sperandio,V., Giron,J.A., Shin,S., Mellies,J.L., Wainwright,L., Hutcheson, S.W., McDaniel,T.K., and Kaper,J.B. (2000). The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 68: 6115-6126.

Elliott,S.J., Wainwright,L.A., McDaniel,T.K., Jarvis,K.G., Deng,Y.K., Lai,L.C., McNamara,B.P., Donnenberg,M.S., and Kaper,J.B. (1998). The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 28: 1-4.

Espie,E., Vaillant,V., Mariani-Kurkdjian,P., Grimont,F., Martin-Schaller,R., De Valk,H., and Vernozy-Rozand,C. (2006). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with fresh unpasteurized goats' cheese. *Epidemiol Infect* 134: 143-146.

Feldman,K.A., Mohle-Boetani,J.C., Ward,J., Furst,K., Abbott,S.L., Ferrero,D.V., Olsen,A., and Werner,S.B. (2002). A cluster of *Escherichia coli* O157: nonmotile infections associated with recreational exposure to lake water. *Public Health Rep* 117: 380-385.

Ferguson,D.D., Scheftel,J., Cronquist,A., Smith,K., Woo-Ming,A., Anderson,E., Knutsen,J., De,A.K., and Gershman,K. (2005). Temporally distinct *Escherichia coli* O157 outbreaks associated with alfalfa sprouts linked to a common seed source--Colorado and Minnesota, 2003. *Epidemiol Infect* 133: 439-447.

Fitzhenry,R.J., Pickard,D.J., Hartland,E.L., Reece,S., Dougan,G., Phillips,A.D., and Frankel,G. (2002). Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut* 50: 180-185.

Forestier,C., Darfeuille-Michaud,A., Wasch,E., Rich,C., Petat,E., Denis,F., and Joly,B. (1989). Adhesive properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea in Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8: 979-983.

Foster,J.W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* 2: 898-907.

Frankel,G., Phillips,A.D., Rosenshine,I., Dougan,G., Kaper,J.B., and Knutton,S. (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* 30: 911-921.

Friedberg,D., Umanski,T., Fang,Y., and Rosenshine,I. (1999). Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 34: 941-952.

- Friedrich,A.W., Bielaszewska,M., Zhang,W.L., Pulz,M., Kuczius,T., Ammon,A., and Karch,H. (2002). *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J Infect Dis 185: 74-84.
- Fuchs,S., Mühldorfer,I., Donohue-Rolfe,A., Kerenyi,M., Emody,L., Alexiev,R., Nenkov,P., and Hacker,J. (1999). Influence of RecA on *in vivo* virulence and Shiga toxin 2 production in *Escherichia coli* pathogens. Microb Pathog 27: 13-23.
- Galanis,E., Longmore,K., Hasselback,P., Swann,D., Ellis,A., and Panaro,L. (2003). Investigation of an *E. coli* O157:H7 outbreak in Brooks, Alberta, June-July 2002: the role of occult cases in the spread of infection within a daycare setting. Can Commun Dis Rep 29: 21-28.
- Garcia,A., and Fox,J.G. (2003). The rabbit as a new reservoir host of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis 9: 1592-1597.
- Garmendia,J., and Frankel,G. (2005). Operon structure and gene expression of the *espJ-tccP* locus of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. FEMS Microbiol Lett 247: 137-145.
- Garmendia,J., Frankel,G., and Crepin,V.F. (2005a). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. Infect Immun 73: 2573-2585.
- Garmendia,J., Phillips,A.D., Carlier,M.F., Chong,Y., Schüller,S., Marchés,O., Dahan,S., Oswald,E., Shaw,R.K., Knutton,S., and Frankel,G. (2004). TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. Cell Microbiol 6: 1167-1183.
- Garmendia,J., Ren,Z., Tennant,S., Aparecida,M., Viera,M., Chong,Y., Whale,A., Azzopardi,K., Dahan,S., Sircili,M.P., Franzolin,M.R., Trabulsi,L.R., Phillips,A., Gomes,T.A.T., Xu,J., Robins-Browne,R., and Frankel,G. (2005b). Distribution of *tccP* in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. J Clin Microbiol 43: 5715-5720.
- Goldberg,M.D., Johnson,M., Hinton,J.C., and Williams,P.H. (2001). Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol 41: 549-559.

- Grant,A.J., Farris,M., Alefounder,P., Williams,P.H., Woodward,M.J., and O'Connor,C.D. (2003). Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol* 48: 507-521.
- Grif,K., Dierich,M.P., Karch,H., and Allerberger,F. (1998). Strain-specific differences in the amount of Shiga toxin released from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 following exposure to subinhibitory concentrations of antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 17: 761-766.
- Grif,K., Orth,D., Lederer,I., Berghold,C., Roedl,S., Mache,C.J., Dierich,M.P., and Würzner,R. (2005). Importance of environmental transmission in cases of EHEC O157 causing hemolytic uremic syndrome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24: 268-271.
- Griffin,P.M., and Tauxe,R.V. (1991). The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 13: 60-98.
- Gruenheid,S., Sekirov,I., Thomas,N.A., Deng,W., O'Donnell,P., Goode,D., Li,Y., Frey,E.A., Brown,N.F., Metalnikov,P., Pawson,T., Ashman,K., and Finlay,B.B. (2004). Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 51: 1233-1249.
- Grys,T.E., Siegel,M.B., Lathem,W.W., and Welch,R.A. (2005). The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun* 73: 1295-1303.
- Haack,K.R., Robinson,C.L., Miller,K.J., Fowlkes,J.W., and Mellies,J.L. (2003). Interaction of Ler at the *LEE5 (tir)* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 71: 384-392.
- Hacker,J., Blum-Oehler,G., Mühldorfer,I., and Tschäpe,H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Mol Microbiol* 23: 1089-1097.
- Hall,T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.

Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J Mol Biol 166: 557-580.

Hartleib,S., Prager,R., Hedenström,I., Löfdahl,S., and Tschäpe, H. (2003). Prevalence of the new, SPI1-like, pathogenicity island ETT2 among *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol 292: 487-493.

Hayashi,T., Makino,K., Ohnishi,M., Kurokawa,K., Ishii,K., Yokoyama,K., Han,C.G., Ohtsubo,E., Nakayama,K., Murata,T., Tanaka,M., Tobe,T., Iida,T., Takami,H., Honda,T., Sasakawa,C., Ogasawara,N., Yasunaga,T., Kuhara,S., Shiba,T., Hattori,M., and Shinagawa,H. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. DNA Res 8: 11-22.

Hempel,H. (2003). Molekulare Analyse des Shiga Toxin 1-kodierenden Prophagen Phi 1639. Diplomarbeit. Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. Medizinische Fakultät Carl Gustav Carus. Technische Universität Dresden.

Hendrix,R.W., Lawrence,J.G., Hatfull,G.F., and Casjens,S. (2000). The origins and ongoing evolution of viruses. Trends Microbiol 8: 504-508.

Herold,S., Karch,H., and Schmidt,H. (2004). Shiga toxin-encoding bacteriophages--genomes in motion. Int J Med Microbiol 294: 115-121.

Heuvelink,A.E., van Heerwaarden,C., Zwartkruis-Nahuis,J.T., van Oosterom,R., Edink,K., van Duynhoven,Y.T., and de Boer,E. (2002). *Escherichia coli* O157 infection associated with a petting zoo. Epidemiol Infect 129: 295-302.

Heuvelink,A.E., Zwartkruis-Nahuis,J.T., van den Biggelaar,F.L., van Leeuwen,W.J., and de Boer,E. (1999). Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from slaughter pigs and poultry. Int J Food Microbiol 52: 67-75.

Hilborn,E.D., Mermin,J.H., Mshar,P.A., Hadler,J.L., Voetsch,A., Wojtkunski,C., Swartz,M., Mshar,R., Lambert-Fair,M.A., Farrar,J.A., Glynn,M.K., and Slutsker,L. (1999). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with consumption of mesclun lettuce. Arch Intern Med 159: 1758-1764.

Honish,L., Predy,G., Hislop,N., Chui,L., Kowalewska-Grochowska,K., Trottier,L., Kreplin,C., and Zazulak,I. (2005). An outbreak of *E. coli* O157:H7 hemorrhagic colitis associated with unpasteurized gouda cheese. *Can J Public Health* 96: 182-184.

Ikeda,K., Ida,O., Kimoto,K., Takatorige,T., Nakanishi,N., and Tatara,K. (1999). Effect of early fosfomycin treatment on prevention of hemolytic uremic syndrome accompanying *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Clin Nephrol* 52: 357-362.

Iwasa,M., Makino,S., Asakura,H., Kobori,H., and Morimoto,Y. (1999). Detection of *Escherichia coli* O157:H7 from *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) at a cattle farm in Japan. *J Med Entomol* 36: 108-112.

Iyoda,S., and Watanabe,H. (2004). Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to Hep-2 cells. *Microbiology* 150: 2357-2371.

Iyoda,S., and Watanabe,H. (2005). ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GlrR levels in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187: 4086-4094.

Janka,A., Bielaszewska,M., Dobrindt,U., Greune,L., Schmidt,M.A., and Karch,H. (2003). Cytolethal distending toxin gene cluster in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H⁻ and O157:H7: characterization and evolutionary considerations. *Infect Immun* 71: 3634-3638.

Jarvis,K.G., Giron,J.A., Jerse,A.E., McDaniel,T.K., Donnenberg,M.S., and Kaper,J.B. (1995). Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7996-8000.

Jelacic,J.K., Damrow,T., Chen,G.S., Jelacic,S., Bielaszewska,M., Ciol,M., Carvalho, H.M., Melton-Celsa,A.R., O'Brien,A.D., and Tarr,P.I. (2003). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles. *J Infect Dis* 188: 719-729.

Jin,Q., Yuan,Z., Xu,J., Wang,Y., Shen,Y., Lu,W., Wang,J., Liu,H., Yang,J., Yang,F., Zhang,X., Zhang,J., Yang,G., Wu,H., Qu,D., Dong,J., Sun,L., Xue,Y., Zhao,A., Gao,Y., Zhu,J., Kan,B., Ding,K., Chen,S., Cheng,H., Yao,Z., He,B., Chen,R., Ma,D., Qiang,B., Wen,Y., Hou,Y., and Yu,J. (2002). Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res* 30: 4432-4441.

Johansen,B.K., Wasteson,Y., Granum,P.E., and Brynestad,S. (2001). Mosaic structure of Shiga-toxin-2-encoding phages isolated from *Escherichia coli* O157:H7 indicates frequent gene exchange between lambdoid phage genomes. *Microbiology* 147: 1929-1936.

Jores,J., Rumer,L., Kiessling,S., Kaper,J.B., and Wieler,L.H. (2001). A novel locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island inserted at *pheV* in bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strain O103:H2. *FEMS Microbiol Lett* 204: 75-79.

Jores,J., Wagner,S., Rumer,L., Eichberg,J., Laturnus,C., Kirsch,P., Schierack,P., Tschäpe,H., and Wieler,L.H. (2005). Description of a 111-kb pathogenicity island (PAI) encoding various virulence features in the enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) strain RW1374 (O103:H2) and detection of a similar PAI in other EHEC strains of serotype O103:H2. *Int J Med Microbiol* 294: 417-425.

Kaper,J.B., and Sperandio,V. (2005). Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 73: 3197-3209.

Karch,H., Rüssmann,H., Schmidt,H., Schwarzkopf,A., and Heesemann,J. (1995). Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 in diarrheal diseases. *J Clin Microbiol* 33: 1602-1605.

Karch,H., Schubert,S., Zhang,D., Zhang,W., Schmidt,H., Ölschläger,T., and Hacker, J. (1999). A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect Immun* 67: 5994-6001.

Karch,H., Tarr,P.I., and Bielaszewska,M. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine. *Int J Med Microbiol* 295: 405-418.

Karmali,M.A. (2004). Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. Mol Biotechnol 26: 117-122.

Karmali,M.A., Petric,M., Lim,C., Fleming,P.C., and Steele,B.T. (1983a). *Escherichia coli* cytotoxin, haemolytic-uraemic syndrome, and haemorrhagic colitis. Lancet 2: 1299-1300.

Karmali,M.A., Steele,B.T., Petric,M., and Lim,C. (1983b). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet 1: 619-620.

Keene,W.E., McAnulty,J.M., Hoesly,F.C., Williams,L.P.,Jr., Hedberg,K., Oxman,G.L., Barrett,T.J., Pfaller,M.A., and Fleming,D.W. (1994). A swimming-associated outbreak of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 and *Shigella sonnei*. N Engl J Med 331: 579-584.

Keene,W.E., Sazie,E., Kok,J., Rice,D.H., Hancock,D.D., Balan,V.K., Zhao,T., and Doyle,M.P. (1997). An outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections traced to jerky made from deer meat. JAMA 277: 1229-1231.

Kelly,M., Hart,E., Mundy,R., Marchés,O., Wiles,S., Badea,L., Luck,S., Tauschek,M., Frankel,G., Robins-Browne,R.M., and Hartland,E.L. (2006). Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of mice by *Citrobacter rodentium*. Infect Immun 74: 2328-2337.

Kenny,B., Abe,A., Stein,M., and Finlay,B.B. (1997). Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. Infect Immun 65: 2606-2612.

Kimmitt,P.T., Harwood,C.R., and Barer,M.R. (2000). Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response. Emerg Infect Dis 6: 458-465.

Kitov,P.I., Sadowska,J.M., Mulvey,G., Armstrong,G.D., Ling,H., Pannu,N.S., Read,R.J., and Bundle,D.R. (2000). Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. Nature 403: 669-672.

- Knutton,S., Lloyd,D.R., and McNeish,A.S. (1987). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* 55: 69-77.
- Kobayashi,M., Sasaki,T., Saito,N., Tamura,K., Suzuki,K., Watanabe,H., and Agui,N. (1999). Houseflies: not simple mechanical vectors of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Am J Trop Med Hyg* 61: 625-629.
- Köhler,B. (2001). Phänotypische und Molekularbiologische Charakterisierung von Shiga Toxin-konvertierenden Bakteriophagen. Dissertation. Institut für Hygiene und Mikrobiologie. Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Köhler,B., Karch,H., and Schmidt,H. (2000). Antibacterials that are used as growth promoters in animal husbandry can affect the release of Shiga-toxin-2-converting bacteriophages and Shiga toxin 2 from *Escherichia coli* strains. *Microbiology* 146: 1085-1090.
- Konowalchuk,J., Speirs,J.I., and Stavric,S. (1977). Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 18: 775-779.
- Kullas,H., Coles,M., Rhyan,J., and Clark,L. (2002). Prevalence of *Escherichia coli* serogroups and human virulence factors in faeces of urban Canada geese (*Branta canadensis*). *Int J Environ Health Res* 12: 153-162.
- Laaberki,M.H., Janabi,N., Oswald,E., and Repoila,F. (2006). Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int J Med Microbiol* 296: 197-210.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lathem,W.W., Bergsbaken,T., and Welch,R.A. (2004). Potentiation of C1 esterase inhibitor by StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7. *J Exp Med* 199: 1077-1087.
- Lathem,W.W., Gryns,T.E., Witowski,S.E., Torres,A.G., Kaper,J.B., Tarr,P.I., and Welch,R.A. (2002). StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol* 45: 277-288.

- Law,D., and Kelly,J. (1995). Use of heme and hemoglobin by *Escherichia coli* O157 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* serogroups. Infect Immun 63: 700-702.
- Leclercq,A., and Mahillon,J. (2003). Farmed rabbits and ducks as vectors for VTEC O157:H7. Vet Rec 152: 723-724.
- Leung,P.H., Peiris,J.S., Ng,W.W., Robins-Browne,R.M., Bettelheim,K.A., and Yam, W.C. (2003). A newly discovered verotoxin variant, VT2g, produced by bovine verocytotoxigenic *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 69: 7549-7553.
- Levine,M.M., Xu,J.G., Kaper,J.B., Lior,H., Prado,V., Tall,B., Nataro,J., Karch,H., and Wachsmuth,K. (1987). A DNA probe to identify enterohemorrhagic *Escherichia coli* of O157:H7 and other serotypes that cause hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. J Infect Dis 156: 175-182.
- Li,M., Rosenshine,I., Yu,H.B., Nadler,C., Mills,E., Hew,C.L., and Leung,K.Y. (2006). Identification and characterization of NleI, a new non-LEE-encoded effector of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Microbes Infect 8: 2890-2898.
- Lin,Z., Kurazono,H., Yamasaki,S., and Takeda,Y. (1993). Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. Microbiol Immunol 37: 543-548.
- Lio,J.C.W., and Syu,W.J. (2004). Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Biomed Sci 11: 855-863.
- Ludwig,K., Sarkim,V., Bitzan,M., Karmali,M.A., Bobrowski,C., Ruder,H., Laufs,R., Sobottka,I., Petric,M., Karch,H., and Müller-Wiefel,D.E. (2002). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection and antibodies against Stx2 and Stx1 in household contacts of children with enteropathic hemolytic-uremic syndrome. J Clin Microbiol 40: 1773-1782.
- Lukashin,A.V., and Borodovsky,M. (1998). GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. Nucleic Acids Res 26: 1107-1115.

- Lyte,M., Arulanandam,B., Nguyen,K., Frank,C., Erickson,A., and Francis,D. (1997). Norepinephrine induced growth and expression of virulence associated factors in enterotoxigenic and enterohemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* 412: 331-339.
- MacConnachie,A.A., and Todd,W.T. (2004). Potential therapeutic agents for the prevention and treatment of haemolytic uraemic syndrome in Shiga toxin producing *Escherichia coli* infection. *Curr Opin Infect Dis* 17: 479-482.
- MacLeod,D.L., Gyles,C.L., and Wilcock,B.P. (1991). Reproduction of edema disease of swine with purified Shiga-like toxin-II variant. *Vet Pathol* 28: 66-73.
- Makino,S., Kobori,H., Asakura,H., Watarai,M., Shirahata,T., Ikeda,T., Takeshi,K., and Tsukamoto,T. (2000). Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from seagulls. *Epidemiol Infect* 125: 55-61.
- Marchés,O., Ledger,T.N., Boury,M., Ohara,M., Tu,X., Goffaux,F., Mainil,J., Rosen-shine,I., Sugai,M., De Rycke,J., and Oswald,E. (2003). Enteropathogenic and entero-haemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G₂/M transition. *Mol Microbiol* 50: 1553-1567.
- Marchés,O., Wiles,S., Dziva,F., La Ragione,R.M., Schüller,S., Best,A., Phillips,A.D., Hartland,E.L., Woodward,M.J., Stevens,M.P., and Frankel,G. (2005). Characteri-zation of two non-locus of enterocyte effacement-encoded type III-translocated effectors, NleC and NleD, in attaching and effacing pathogens. *Infect Immun* 73: 8411-8417.
- Mariani-Kurkdjian,P., Denamur,E., Milon,A., Picard,B., Cave,H., Lambert-Zechovsky, N., Loirat,C., Goullet,P., Sansonetti,P.J., and Elion,J. (1993). Identification of a clone of *Escherichia coli* O103:H2 as a potential agent of hemolytic-uremic syndrome in France. *J Clin Microbiol* 31: 296-301.
- Matsushiro,A., Sato,K., Miyamoto,H., Yamamura,T., and Honda,T. (1999). Induction of prophages of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 with norfloxacin. *J Bacteriol* 181: 2257-2260.

McDaniel,T.K., Jarvis,K.G., Donnenberg,M.S., and Kaper,J.B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1664-1668.

McIntyre,L., Fung,J., Paccagnella,A., Isaac-Renton,J., Rockwell,F., Emerson,B., and Preston,T. (2002). *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia, 2001. *Can Commun Dis Rep* 28: 6-8.

Mellies,J.L., Elliott,S.J., Sperandio,V., Donnenberg,M.S., and Kaper,J.B. (1999). The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* 33: 296-306.

Melton-Celsa,A.R., Darnell,S.C., and O'Brien,A.D. (1996). Activation of Shiga-like toxin by mouse and human intestinal mucus correlates with virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91:H21 isolates in orally infected, streptomycin-treated mice. *Infect Immun* 64: 1569-1576.

Michino,H., Araki,K., Minami,S., Takaya,S., Sakai,N., Miyazaki,M., Ono,A., and Yanagawa,H. (1999). Massive outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in schoolchildren in Sakai City, Japan, associated with consumption of white radish sprouts. *Am J Epidemiol* 150: 787-796.

Milne,L.M., Plom,A., Strudley,I., Pritchard,G.C., Crooks,R., Hall,M., Duckworth,G., Seng,C., Susman,M.D., Kearney,J., Wiggins,R.J., Moulds,M., Cheasty,T., and Willshaw,G.A. (1999). *Escherichia coli* O157 incident associated with a farm open to members of the public. *Commun Dis Public Health* 2: 22-26.

Mukherjee,J., Chios,K., Fishwild,D., Hudson,D., O'Donnell,S., Rich,S.M., Donohue-Rolfe,A., and Tzipori,S. (2002a). Human Stx2-specific monoclonal antibodies prevent systemic complications of *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun* 70: 612-619.

Mukherjee,J., Chios,K., Fishwild,D., Hudson,D., O'Donnell,S., Rich,S.M., Donohue-Rolfe,A., and Tzipori,S. (2002b). Production and characterization of protective human antibodies against Shiga toxin 1. *Infect Immun* 70: 5896-5899.

- Mundy,R., Jenkins,C., Yu,J., Smith,H., and Frankel,G. (2004a). Distribution of *espl* among clinical enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. J Med Microbiol 53: 1145-1149.
- Mundy,R., Petrovska,L., Smollett,K., Simpson,N., Wilson,R.K., Yu,J., Tu,X., Rosenshine,I., Clare,S., Dougan,G., and Frankel,G. (2004b). Identification of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, Espl, and roles of this and other secreted proteins in infection. Infect Immun 72: 2288-2302.
- Nakanishi,N., Abe,H., Ogura,Y., Hayashi,T., Tashiro,K., Kuhara,S., Sugimoto,N., and Tobe,T. (2006). ppGpp with DksA controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. Mol Microbiol 61: 194-205.
- Napoli,C., and Staskawicz,B. (1987). Molecular characterization and nucleic acid sequence of an avirulence gene from race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. J Bacteriol 169: 572-578.
- Nataro,J.P., and Kaper,J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11: 142-201.
- Nicholls,L., Grant,T.H., and Robins-Browne,R.M. (2000). Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. Mol Microbiol 35: 275-288.
- Nielsen,E.M., Skov,M.N., Madsen,J.J., Lodal,J., Jespersen,J.B., and Baggesen,D.L. (2004). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in wild birds and rodents in close proximity to farms. Appl Environ Microbiol 70: 6944-6947.
- O'Brien,A.D., and LaVeck,G.D. (1983). Purification and chracterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. Infect Immun 40: 675-683.
- O'Brien,A.D., Lively,T.A., Chang,T.W., and Gorbach,S.L. (1983a). Purification of *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga)-like toxin from *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with haemorrhagic colitis. Lancet 2: 573.

- O'Brien,A.D., Lively,T.A., Chen,M.E., Rothman,S.W., and Formal,S.B. (1983b). *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. Lancet 1: 702.
- O'Brien,A.D., Newland,J.W., Miller,S.F., Holmes,R.K., Smith,H.W., and Formal,S.B. (1984). Shiga-like toxin-converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science 226: 694-696.
- O'Loughlin,E.V., and Robins-Browne,R.M. (2001). Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. Microbes Infect 3: 493-507.
- Ochoa,T.J., and Cleary,T.G. (2003). Epidemiology and spectrum of disease of *Escherichia coli* O157. Curr Opin Infect Dis 16: 259-263.
- Ogino,T., Ohno,R., Sekiya,K., Kuwae,A., Matsuzawa,T., Nonaka,T., Fukuda,H., Imajoh-Ohmi,S., and Abe,A. (2006). Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol 188: 2801-2811.
- Olsen,S.J., Miller,G., Breuer,T., Kennedy,M., Higgins,C., Walford,J., McKee,G., Fox,K., Bibb,W., and Mead,P. (2002). A waterborne outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections and hemolytic uremic syndrome: implications for rural water systems. Emerg Infect Dis 8: 370-375.
- Orskov,F., Orskov,I., and Villar,J.A. (1987). Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. Lancet 2: 276.
- Oswald,E., Schmidt,H., Morabito,S., Karch,H., Marchés,O., and Caprioli,A. (2000). Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. Infect Immun 68: 64-71.
- Panos,G.Z., Betsi,G.I., and Falagas,M.E. (2006). Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? Aliment Pharmacol Ther 24: 731-742.
- Paton,A.W., Beddoe,T., Thorpe,C.M., Whisstock,J.C., Wilce,M.C.J., Rossjohn,J., Talbot,U.M., and Paton,J.C. (2006). AB₅ subtilase cytotoxin inactivates the endoplasmatic reticulum chaperone BiP. Nature 443: 548-552.

Paton,A.W., Morona,R., and Paton,J.C. (2000). A new biological agent for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections and dysentery in humans. Nat Med 6: 265-270.

Paton,J.C., and Paton,A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Clin Microbiol Rev 11: 450-479.

Paton,A.W., Ratcliff,R.M., Doyle,R.M., Seymour-Murray,J., Davos,D., Lanser,J.A., and Paton,J.C. (1996). Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolytic-uremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 34: 1622-1627.

Paton,A.W., Srimanote,P., Talbot,U.M., Wang,H., and Paton,J.C. (2004). A new family of potent AB₅ cytotoxins produced by Shiga toxigenic *Escherichia coli*. J Exp Med 200: 35-46.

Paton,A.W., Srimanote,P., Woodrow,M.C., and Paton,J.C. (2001). Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. Infect Immun 69: 6999-7009.

Perna,N.T., Mayhew,G.F., Pósfai,G., Elliott,S., Donnenberg,M.S., Kaper,J.B., and Blattner,F.R. (1998). Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 66: 3810-3817.

Perna,N.T., Plunkett,G.,III, Burland,V., Mau,B., Glasner,J.D., Rose,D.J., Mayhew,G.F., Evans,P.S., Gregor,J., Kirkpatrick,H.A., Pósfai,G., Hackett,J., Klink,S., Boutin,A., Shao,Y., Miller,L., Grotbeck,E.J., Davis,N.W., Lim,A., Dimalanta,E.T., Pota-mousis,K.D., Apodaca,J., Anantharaman,T.S., Lin,J., Yen,G., Schwartz,D.C., Welch,R.A., and Blattner,F.R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Esche-ri-cha coli* O157:H7. Nature 409: 529-533.

Pinyon,R.A., Paton,J.C., Paton,A.W., Botten,J.A., and Morona,R. (2004). Refinement of a therapeutic Shiga toxin-binding probiotic for human trials. J Infect Dis 189 : 1547-1555.

- Plunkett,G.,III, Rose,D.J., Durfee,T.J., and Blattner,F.R. (1999). Sequence of Shiga toxin 2 phage 933W from *Escherichia coli* O157:H7: Shiga toxin as a phage late-gene product. J Bacteriol 181: 1767-1778.
- Porter,M.E., Mitchell,P., Roe,A.J., Free,A., Smith,D.G., and Gally,D.L. (2004). Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol 54: 1117-1133.
- Prager,R., Annemüller,S., and Tschäpe,H. (2005). Diversity of virulence patterns among shiga toxin-producing *Escherichia coli* from human clinical cases—need for more detailed diagnostics. Int J Med Microbiol 295: 29-38.
- Pridmore,R.D. (1987). New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. Gene 56: 309-312.
- Pritchard,G.C., Williamson,S., Carson,T., Bailey,J.R., Warner,L., Willshaw,G., and Cheasty,T. (2001). Wild rabbits--a novel vector for verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. Vet Rec 149: 567.
- Rangel,J.M., Sparling,P.H., Crowe,C., Griffin,P.M., and Swerdlow,D.L. (2005). Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. Emerg Infect Dis 11: 603-609.
- Rashid,R.A., Tarr,P.I., and Moseley,S.L. (2006). Expression of the *Escherichia coli* IrgA homolog adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. Microb Pathog 41: 207-217.
- Razzaq,S. (2006). Hemolytic uremic syndrome: an emerging health risk. Am Fam Physician 74: 991-996.
- Recktenwald, J., and Schmidt,H. (2002). The nucleotide sequence of Shiga toxin (Stx) 2e-encoding phage ϕ P27 is not related to other Stx phage genomes, but the modular genetic structure is conserved. Infect Immun 70: 1896-1908.
- Ren,C.P., Chaudhuri,R.R., Fivian,A., Bailey,C.M., Antonio,M., Barnes,W.M., and Pallen,M.J. (2004). The ETT2 gene cluster, encoding a second type III secretion system from *Escherichia coli*, is present in the majority of strains but has undergone widespread mutational attrition. J Bacteriol 186: 3547-3560.

Renter,D.G., Sargeant,J.M., Hygnstorm,S.E., Hoffman,J.D., and Gillespie,J.R. (2001). *Escherichia coli* O157:H7 in free-ranging deer in Nebraska. J Wildl Dis 37: 755-760.

Riley,L.W., Remis,R.S., Helgerson,S.D., McGee,H.B., Wells,J.G., Davis,B.R., Hebert, R.J., Olcott,E.S., Johnson,L.M., Hargrett,N.T., Blake,P.A., and Cohen,M.L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med 308: 681-685.

Robert Koch Institut (2006). Ausgewählte Zoonosen im Jahr 2005: Durch Lebensmittel übertragbare bakterielle gastrointestinale Infektionen. Epidemiologisches Bulletin 41: 352-356.

Rodrigue,D.C., Mast,E.E., Greene,K.D., Davis,J.P., Hutchinson,M.A., Wells,J.G., Barrett,T.J., and Griffin,P.M. (1995). A university outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections associated with roast beef and an unusually benign clinical course. J Infect Dis 172: 1122-1125.

Rosenshine,I., Ruschkowski,S., and Finlay,B.B. (1996). Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. Infect Immun 64: 966-973.

Samadpour,M., Ongerth,J.E., Liston,J., Tran,N., Nguyen,D., Whittam,T.S., Wilson,R.A., and Tarr,P.I. (1994). Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. Appl Environ Microbiol 60: 1038-1040.

Sancak,A.A., Rutgers,H.C., Hart,C.A., and Batt,R.M. (2004). Prevalence of enteropathic *Escherichia coli* in dogs with acute and chronic diarrhoea. Vet Rec 154: 101-106.

Sanger,F., Coulson,A.R., Hong,G.F., Hill,D.F., and Petersen,G.B. (1982). Nucleotide sequence of bacteriophage lambda DNA. J Mol Biol 162: 729-773.

Sanger,F., Nicklen,S., and Coulson,A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 74: 5463-5467.

Sato,T., Shimizu,T., Watarai,M., Kobayashi,M., Kano,S., Hamabata,T., Takeda,Y., and Yamasaki,S. (2003). Genome analysis of a novel Shiga toxin 1 (Stx1)-converting phage which is closely related to Stx2-converting phages but not to other Stx1-converting phages. J Bacteriol 185: 3966-3971.

Schmidt,H. (2001). Shiga-toxin-converting bacteriophages. Res Microbiol 152: 687-695.

Schmidt,H., Beutin,L., and Karch,H. (1995). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. Infect Immun 63: 1055-1061.

Schmidt,H., Geitz,C., Tarr,P.I., Frosch,M., and Karch,H. (1999). Non-O157:H7 pathogenic Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: phenotypic and genetic profiling of virulence traits and evidence for clonality. J Infect Dis 179: 115-123.

Schmidt,H., Henkel,B., and Karch,H. (1997). A gene cluster closely related to type II secretion pathway operons of gram-negative bacteria is located on the large plasmid of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains. FEMS Microbiol Lett 148: 265-272.

Schmidt,H., and Hensel,M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev 17: 14-56.

Schmidt,H., Karch,H., and Beutin,L. (1994a). The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. FEMS Microbiol Lett 117: 189-196.

Schmidt,H., Kernbach,C., and Karch,H. (1996a). Analysis of the EHEC *hly* operon and its location in the physical map of the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Microbiology 142: 907-914.

Schmidt,H., Maier,E., Karch,H., and Benz,R. (1996b). Pore-forming properties of the plasmid-encoded hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Eur J Biochem 241: 594-601.

Schmidt,H., Plaschke,B., Franke,S., Rüssmann,H., Schwarzkopf,A., Heesemann,J., and Karch,H. (1994b). Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing *eae* genes. Med Microbiol Immunol 183: 23-31.

Schmidt,H., Rüssmann,H., and Karch,H. (1993). Virulence determinants in non-toxinogenic *Escherichia coli* O157 strains that cause infantile diarrhea. Infect Immun 61: 4894-4898.

Schmidt,H., Rüssmann,H., Schwarzkopf,A., Aleksic,S., Heesemann,J., and Karch,H. (1994c). Prevalence of attaching and effacing *Escherichia coli* in stool samples from patients and controls. Zentralbl Bakteriol 281: 201-213.

Schmidt,H., Scheef,J., Morabito,S., Caprioli,A., Wieler,L.H., and Karch,H. (2000). A new Shiga toxin 2 variant (Stx2f) from *Escherichia coli* isolated from pigeons. Appl Environ Microbiol 66: 1205-1208.

Schmidt,H., Zhang,W.L., Hemmrich,U., Jelacic,S., Brunder,W., Tarr,P.I., Dobrindt,U., Hacker,J., and Karch,H. (2001). Identification and characterization of a novel genomic island integrated at *selC* in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Infect Immun 69: 6863-6873.

Schmitt,C.K., McKee,M.L., and O'Brien,A.D. (1991). Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains are responsible for the antigenic heterogeneity of the O157:H⁻ strain E32511. Infect Immun 59: 1065-1073.

Seigneur,M., Ehrlich,S.D., and Michel,B. (1999). *recD sbcB sbcD* mutants are deficient in recombinational repair of UV lesions by RecBC. J Bacteriol 181: 6220-6221.

Sharma,V.K., and Zuerner,R.L. (2004). Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Bacteriol 186: 7290-7301.

Smith,K.E., Stenzel,S.A., Bender,J.B., Wagstrom,E., Soderlund,D., Leano,F.T., Taylor,C.M., Belle-Isle,P.A., and Danila,R. (2004). Outbreaks of enteric infections caused by multiple pathogens associated with calves at a farm day camp. Pediatr Infect Dis J 23: 1098-1104.

- Smith,M.J., Teel,L.D., Carvalho,H.M., Melton-Celsa,A.R., and O'Brien,A.D. (2006). Development of a hybrid Shiga holotoxoid vaccine to elicit heterologous protection against Shiga toxins types 1 and 2. *Vaccine* 24: 4122-4129.
- Sperandio,V., Kaper,J.B., Bortolini,M.R., Neves,B.C., Keller,R., and Trabulsi,L.R. (1998). Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* 164: 133-139.
- Sperandio,V., Li,C.C., and Kaper,J.B. (2002). Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Infect Immun* 70: 3085-3093.
- Stenutz,R., Weintraub,A., and Widmalm,G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev* 30: 382-403.
- Strachan,N.J., Doyle,M.P., Kasuga,F., Rotariu,O., and Ogden,I.D. (2005). Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks. *Int J Food Microbiol* 103: 35-47.
- Sung,L.M., Jackson,M.P., O'Brien,A.D., and Holmes,R.K. (1990). Transcription of the Shiga-like toxin type II and Shiga-like toxin type II variant operons of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 172: 6386-6395.
- Swerdlow,D.L., Woodruff,B.A., Brady,R.C., Griffin,P.M., Tippet,S., Donnell,H.D.,Jr., Geldreich,E., Payne,B.J., Meyer,A.,Jr., and Wells,J.G. (1992). A waterborne outbreak in Missouri of *Escherichia coli* O157:H7 associated with bloody diarrhea and death. *Ann Intern Med* 117: 812-819.
- Taieb,F., Nougayrède,J.P., Watrin,C., Samba-Louaka,A., and Oswald,E. (2006). *Escherichia coli* cyclomodulin Cif induces G₂ arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway. *Cell Microbiol* 8: 1910-1921.
- Taneike,I., Zhang,H.M., Wakisaka-Saito,N., and Yamamoto,T. (2002). Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes. *FEBS Lett* 524: 219-224.

- Tarr,P.I., Bilge,S.S., Vary,J.C.,Jr., Jelacic,S., Habeeb,R.L., Ward,T.R., Baylor,M.R., and Besser,T.E. (2000). Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* 68: 1400-1407.
- Tarr,P.I., Gordon,C.A., and Chandler,W.L. (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet* 365: 1073-1086.
- Tatsuno,I., Horie,M., Abe,H., Miki,T., Makino,K., Shinagawa,H., Taguchi,H., Kamiya,S., Hayashi,T., and Sasakawa,C. (2001). *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* 69: 6660-6669.
- Tatsuno,I., Nagano,K., Taguchi,K., Rong,L., Mori,H., and Sasakawa,C. (2003). Increased adherence to Caco-2 cells caused by disruption of the *yhiE* and *yhiF* genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 71: 2598-2606.
- Te Loo,D.M., van Hinsbergh,V.W., van den Heuvel,L.P., and Monnens,L.A. (2001). Detection of verocytotoxin bound to circulating polymorphonuclear leukocytes of patients with hemolytic uremic syndrome. *J Am Soc Nephrol* 12: 800-806.
- Thomas,N.A., Deng,W., Puente,J.L., Frey,E.A., Yip,C.K., Strynadka,N.C.J., and Finlay,B.B. (2005). CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 57: 1762-1779.
- Thorpe,C.M. (2004). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Clin Infect Dis* 38: 1298-1303.
- Tilden,J.,Jr., Young,W., McNamara,A.M., Custer,C., Boesel,B., Lambert-Fair,M.A., Majkowski,J., Vugia,D., Werner,S.B., Hollingsworth,J., and Morris,J.G.,Jr. (1996). A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health* 86: 1142-1145.
- Tobe,T., Beatson,S.A., Taniguchi,H., Abe,H., Bailey,C.M., Fivian,A., Younis,R., Matthews,S., Marchés,O., Frankel,G., Hayashi,T., and Pallen,M.J. (2006). An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 14941-14946.

- Torres,A.G., Giron,J.A., Perna,N.T., Burland,V., Blattner,F.R., Avelino-Flores,F., and Kaper,J.B. (2002). Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 70: 5416-5427.
- Trachtman,H., Cnaan,A., Christen,E., Gibbs,K., Zhao,S., Acheson,D.W., Weiss,R., Kaskel,F.J., Spitzer,A., and Hirschman,G.H. (2003). Effect of an oral Shiga toxin-binding agent on diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome in children: a randomized controlled trial. *JAMA* 290: 1337-1344.
- Trevena,W.B., Hooper,R.S., Wray,C., Willshaw,G.A., Cheasty,T., and Domingue,G. (1996). Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 associated with companion animals. *Vet Rec* 138: 400.
- Tsai,H.M. (2006). The molecular biology of thrombotic microangiopathy. *Kidney Int* 70: 16-23.
- Unkmeir,A., and Schmidt,H. (2000). Structural analysis of phage-borne *stx* genes and their flanking sequences in shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Shigella dysenteriae* type 1 strains. *Infect Immun* 68: 4856-4864.
- Uzzau,S., Figueroa-Bossi,N., Rubino,S., and Bossi,L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15264-15269.
- Varma,J.K., Greene,K.D., Reller,M.E., DeLong,S.M., Trottier,J., Nowicki,S.F., DiOrio,M., Koch,E.M., Bannerman,T.L., York,S.T., Lambert-Fair,M.A., Wells,J.G., and Mead,P.S. (2003). An outbreak of *Escherichia coli* O157 infection following exposure to a contaminated building. *JAMA* 290: 2709-2712.
- Vlisidou,I., Marchés,O., Dziva,F., Mundy,R., Frankel,G., and Stevens,M.P. (2006). Identification and characterization of EspK, a type III secreted effector protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett* 263: 32-40.
- Wagner,P.L., Acheson,D.W., and Waldor,M.K. (2001a). Human neutrophils and their products induce Shiga toxin production by enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 69: 1934-1937.

- Wagner,P.L., Neely,M.N., Zhang,X., Acheson,D.W., Waldor,M.K., and Friedman,D.I. (2001b). Role for a phage promoter in Shiga toxin 2 expression from a pathogenic *Escherichia coli* strain. J Bacteriol 183: 2081-2085.
- Wagner,P.L., and Waldor,M.K. (2002). Bacteriophage control of bacterial virulence. Infect Immun 70: 3985-3993.
- Waldor,M.K., and Friedman,D.I. (2005). Phage regulatory circuits and virulence gene expression. Curr Opin Microbiol 8: 459-465.
- Wallace,J.S., Cheasty,T., and Jones,K. (1997). Isolation of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from wild birds. J Appl Microbiol 82: 399-404.
- Walters,M., and Sperandio,V. (2006). Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun 74: 5445-5455.
- Wang,G., and Doyle,M.P. (1998). Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. J Food Prot 61: 662-667.
- Wang,G., Zhao,T., and Doyle,M.P. (1996). Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in bovine feces. Appl Environ Microbiol 62: 2567-2570.
- Wang,R.F., and Kushner,S.R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. Gene 100: 195-199.
- Watanabe,M., Matsuoka,K., Kita,E., Igai,K., Higashi,N., Miyagawa,A., Watanabe,T., Yanoshita,R., Samejima,Y., Terunuma,D., Natori,Y., and Nishikawa,K. (2004). Oral therapeutic agents with highly clustered globotriose for treatment of Shiga toxigenic *Escherichia coli* infections. J Infect Dis 189: 360-368.
- Weightman,N.C., and Kirby,P.J. (2000). Nosocomial *Escherichia coli* O157 infection. J Hosp Infect 44: 107-111.
- Weinstein,D.L., Jackson,M.P., Samuel,J.E., Holmes,R.K., and O'Brien,A.D. (1988). Cloning and sequencing of a Shiga-like toxin type II variant from *Escherichia coli* strain responsible for edema disease of swine. J Bacteriol 170: 4223-4230.

- Wen,S.X., Teel,L.D., Judge,N.A., and O'Brien,A.D. (2006). A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 7082-7087.
- Whale,A.D., Garmendia,J., Gomes,T.A., and Frankel,G. (2006). A novel category of enteropathogenic *Escherichia coli* simultaneously utilizes the Nck and TccP pathways to induce actin remodelling. *Cell Microbiol* 8: 999-1008.
- Williams,K.P. (2003). Traffic at the tmRNA gene. *J Bacteriol* 185: 1059-1070.
- Wong,C.S., Jelacic,S., Habeeb,R.L., Watkins,S.L., and Tarr,P.I. (2000). The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. *N Engl J Med* 342: 1930-1936.
- Xu,J., Liu,Q., Jing,H., Pang,B., Yang,J., Zhao,G., and Li,H. (2003). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dung beetles *Catharsius molossus*. *Microbiol Immunol* 47: 45-49.
- Yasuda,T., Morimatsu,K., Horii,T., Nagata,T., and Ohmori,H. (1998). Inhibition of *Escherichia coli* RecA coprotease activities by DinI. *EMBO J* 17: 3207-3216.
- Yee,A.J., De Grandis,S., and Gyles,C.L. (1993). Mitomycin-induced synthesis of a Shiga-like toxin from enteropathogenic *Escherichia coli* H.I.8. *Infect Immun* 61: 4510-4513.
- Yokoyama,K., Makino,K., Kubota,Y., Watanabe,M., Kimura,S., Yutsudo,C.H., Kurokawa,K., Ishii,K., Hattori,M., Tatsuno,I., Abe,H., Yoh,M., Iida,T., Ohnishi,M., Hayashi,T., Yasunaga,T., Honda,T., Sasakawa,C., and Shinagawa,H. (2000). Complete nucleotide sequence of the prophage VT1-Sakai carrying the Shiga toxin 1 genes of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strain derived from the Sakai outbreak. *Gene* 258 :127-139.
- Zhang,L., Chaudhuri,R.R., Constantinidou,C., Hobman,J.L., Patel,M.D., Jones,A.C., Sarti,D., Roe,A.J., Vlisidou,I., Shaw,R.K., Falciani,F., Stevens,M.P., Gally,D.L., Knutton,S., Frankel,G., Penn,C.W., Pallen,M.J. (2004). Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 72: 7282-7293.

Zhang,W., Bielaszewska,M., Kuczius,T., and Karch,H. (2002a). Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx*_{1c}) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. J Clin Microbiol 40: 1441-1446.

Zhang,W.L., Köhler,B., Oswald,E., Beutin,L., Karch,H., Morabito,S., Caprioli,A., Suerbaum,S., and Schmidt,H. (2002b). Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains. J Clin Microbiol 40: 4486-4492.

Zhang,X., McDaniel,A.D., Wolf,L.E., Keusch,G.T., Waldor,M.K., and Acheson,D.W. (2000). Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. J Infect Dis 181: 664-670.

Zschock,M., Hamann,H.P., Kloppert,B., and Wolter,W. (2000). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in faeces of healthy dairy cows, sheep and goats: prevalence and virulence properties. Lett Appl Microbiol 31: 203-208.

7. Anhang

Genkarten, in dieser Arbeit konstruierter Plasmide:

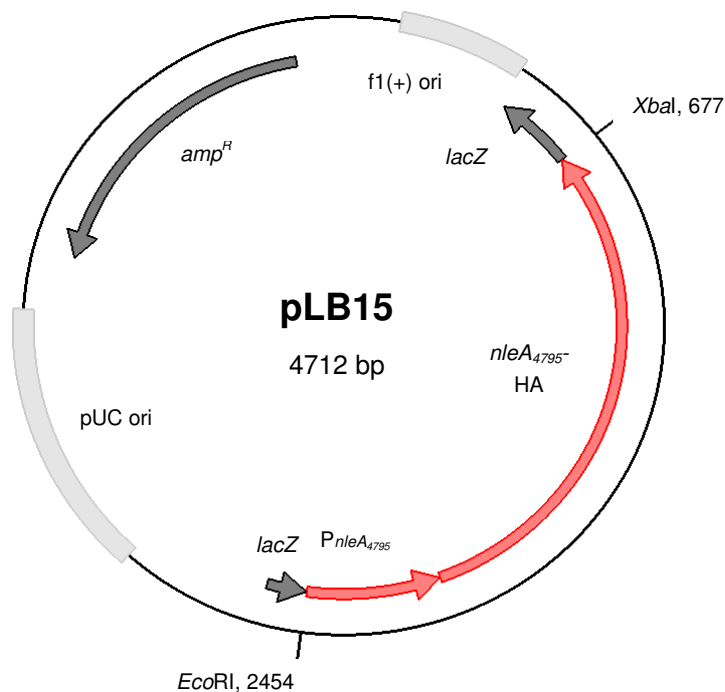


Abbildung Anhang 1: Plasmid pLB15: HA-markiertes *nleA*₄₇₉₅ mit eigenem Promotor in Vektor pBluescriptIIKS+ mit hoher Kopienzahl

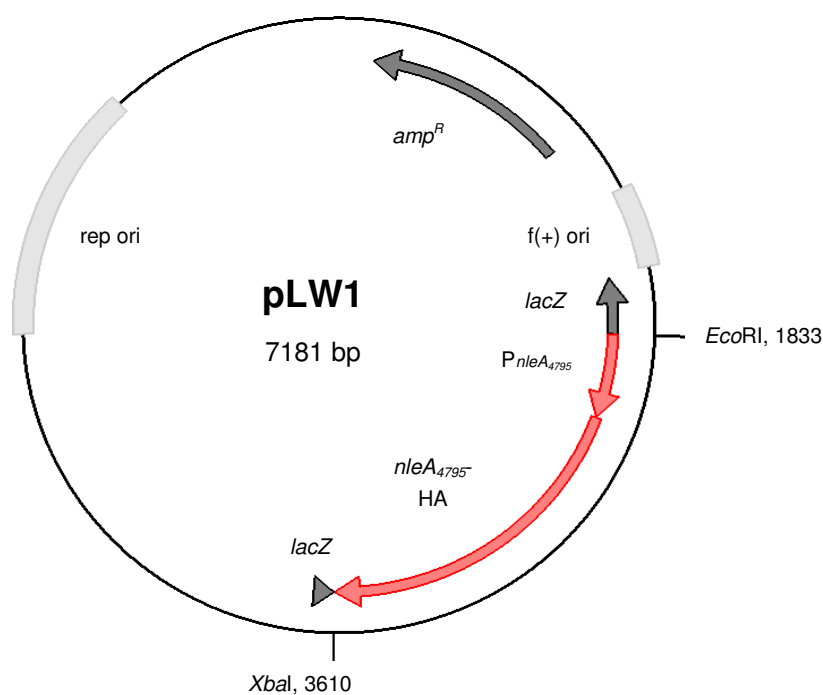


Abbildung Anhang 2: Plasmid pLW1: HA-markiertes *nleA*₄₇₉₅ mit eigenem Promotor in Vektor pWSK29 mit geringer Kopienzahl

Tabelle Anlage 1: Sequenzanalyse von 50625 bp der chromosomalen DNA des *E. coli* O111:H⁻ Stammes 1639/77, die den kryptischen Stx1-konvertierenden Prophagen CP-1639 beinhaltet.

ORF	Start Position	Stop Position	Orientierung	Länge:		Protein mit ähnlicher Sequenz:	Identifikationsnummer	Identität (%)
				ORF (bp)	Protein (aa)	Bezeichnung/Herkunft (Bakterium)		
1	372	1 ¹	<	> 372	>124	hypothetisches Protein YgaF (<i>E. coli</i> K-12)	NP_417146	97 (T)
2	1408	326	<	1083	360	hypothetisches Protein B2659 (<i>E. coli</i> K-12)	D65045	97 (G)
3	1911	1639	<	273	90	hypothetisches Protein B2658 (<i>E. coli</i> K-12)	C65045	100 (G)
4	2682	2050	<	633	210	hypothetisches Protein B2657 (<i>E. coli</i> K-12)	B65045	100 (G)
5	2738	4582	>	1845	614	Histidin Kinase-artige ATPase (<i>Desulfovibrio vulgaris</i>)	YP_010965	41 (T)
6	4584	6332	>	1749	582	hypothetisches Protein (<i>D. vulgaris</i>)	YP_010966	21 (G)
7	6821	6405	<	417	138	hypothetisches Protein	-----	
8	7444	6860	<	585	194	Prophagen Integrase IntA (<i>Yersinia pestis</i>)	NP_670380	55 (T)
9	7551	7880	>	329	109	OrfB Protein eines IS3	NP_085201	86 (T)
10	7886	8212	>	327	108	Transposase OrfA Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	BAB35643	100 (G)
11	8209	9099	>	888	296	Transposase OrfB Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	BAB35642	100 (G)
12	9458	9102	<	357	118	hypothetisches Protein Phage LE1 (<i>Leptospira biflexa</i>)	CAE14763	45 (T)
13	10050	9451	<	600	199	hypothetisches Protein CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288698	95 (T)
14	10214	10047	<	168	55	Gen 23 Protein Phage Sf6	NP_958199	98 (G)
15	10518	10225	<	294	99	Abc2 Protein Phage HK022	NP_037689	96 (G)
16	11044	10532	<	513	170	ss-DNA-Bindeprotein Phage Sf6	NP_958203	93 (G)
17	11686	11045	<	642	213	Rekombinationsprotein, ähnlich Erf (<i>S. flexneri</i>)	NP_958204	96 (T)
18	12128	11577	<	552	183	Transposase OrfB Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	BAB35642	100 (G)
19	12451	12125	<	327	108	Transposase OrfA Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	BAB35643	100 (G)
20	12544	12822	>	279	92	Transkriptionsaktivator Phage Sf6	NP_958216	98 (G)
21	12857	13003	>	147	48	hypothetisches Protein Phage HK620	NP_112056	100 (G)
22	12996	13895	>	900	299	Replikationsprotein O Stx1-Phage (<i>E. coli</i>)	NP_859204	99 (G)
23	13885	15321	>	1437	478	Replikationsprotein P Phage HK620 (<i>E. coli</i>)	NP_112058	100 (G)
24	15321	15590	>	270	89	hypothetisches Protein Phage VT2-Sa (<i>E. coli</i>)	NP_050527	98 (G)
25	15660	15938	>	279	92	hypothetisches Protein Phage VT2-Sa (<i>E. coli</i>)	NP_050528	97 (G)
26	16108	16533	>	427	141	hypothetisches Protein Phage VT2-Sa (<i>E. coli</i>)	NP_311010	97 (G)
27	16391	16936	>	546	181	Protein NinB Phage Nil2 (<i>E. coli</i>)	CAC95094	99 (G)
28	16933	17460	>	528	175	DNA N-6-Adenin-Methyltransferase Dam (<i>E. coli</i>)	NP_311008	100 (G)
29	17914	18618	>	705	234	Antirepressorprotein Ant Phage VT2-Sa (<i>E. coli</i>)	NP_050534	81 (G)
30a	18687	18854	>	168	55	DNA-Bindeprotein Roi Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049496	76 (T)
30b	19195	19416	>	220	73	DNA-Bindeprotein Roi Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049496	100 (T)

ORF	Start Position	Stop Position	Orien- tierung	Länge:		Protein mit ähnlicher Sequenz:	Identifikationsnummer	Identität (%)
				ORF (bp)	Protein (as)	Bezeichnung/Herkunft (Bakterium)		
31	19416	20021	>	606	201	Protein NinG Phage Nil2 (<i>E. coli</i>)	CAC95102	98 (G)
32	20018	20212	>	195	64	Protein NinH Phage BP 933W (<i>E. coli</i>)	Q9ZWX0	100 (G)
33	20166	20639	>	474	157	Antiterminatorprotein Q Stx1-Phage (<i>E. coli</i>)	NP_859219	99 (G)
34	21146	22093	>	948	315	Shiga Toxin 1 A-Untereinheit Phage CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288673	100 (G)
35	22103	22372	>	270	89	Shiga Toxin 1 B-Untereinheit Phage CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288672	100 (G)
36	22756	22433	<	324	107	hypothetisches Protein Stx1-Phage (<i>E. coli</i>)	NP_859223	99 (G)
37	23087	22800	<	288	95	hypothetisches Protein	-----	
38	23017	23154	>	138	45	hypothetisches Phagenprotein (<i>S. enterica</i>)	NP_456378	57 (G)
39	23156	23623	>	468	155	Endopeptidase Rz Phage CP-933O (<i>E. coli</i>)	NP_287576	95 (G)
40	24036	24512	>	477	158	hypothetisches Protein Phage CP-933O (<i>E. coli</i>)	NP_287575	77 (G)
41	24620	26632	>	2013	670	DNA-Verpackungsprotein Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288459	99 (G)
42	26605	26841	>	237	78	hypothetisches Protein (<i>E. coli</i>)	NP_310989	97 (G)
43	26841	28343	>	1503	500	Kopf-Schwanz-Verbindungsprotein CP933-U (<i>E. coli</i>)	AAG57012	99 (G)
44	28192	30312	>	2121	706	Protease/Gerüstprotein (<i>E. coli</i>)	NP_308856	74 (G)
45	30400	30726	>	327	108	hypothetisches Protein Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288453	100 (G)
46	30719	31000	>	282	93	hypothetisches Protein Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288452	97 (G)
47	30997	31626	>	630	209	Schwanzfaserkomponente Z Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288451	91 (G)
48	31639	31785	>	147	48	Schwanzfaserkomponente U Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288450	94 (T)
49	32678	31788	<	891	296	Transposase OrfB Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	NP_288634	99 (G)
50	33001	32675	<	327	108	Transposase OrfA Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	NP_288505	96 (G)
51	33185	33346	>	162	53	Schwanzfaserkomponente U Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288450	100 (T)
52	33354	34106	>	753	250	Schwanzfaserkomponente V Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288449	100 (G)
53	34120	34542	>	423	140	Schwanzfaserkomponente G Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288448	100 (G)
54	34569	34877	>	309	102	Schwanzfaserkomponente T Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288447	100 (G)
55	34921	37566	>	2646	881	Schwanzfaserkomponente H Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288446	99 (G)
56	37563	37892	>	330	109	Schwanzfaserkomponente M Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288445	100 (G)
57	37892	38590	>	699	232	Schwanzfaserkomponente L Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288444	96 (G)
58	38596	39339	>	744	247	Schwanzfaserkomponente K Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288443	96 (G)
59	39371	39913	>	543	180	Schwanzfaserkomponente I Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288442	93 (G)
60	40154	43630	>	3477	1158	Schwanzfaserkomponente J Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288441	95 (G)
61	43697	44296	>	600	199	äußeres Membranprotein Lom Phage CP-933O (<i>E. coli</i>)	NP_287600	98 (G)
62	44361	45683	>	1323	440	Schwanzfaserprotein Phage CP-933R (<i>E. coli</i>)	NP_287775	96 (G)
63	45685	45954	>	270	89	unkanntes Protein Phage CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288641	97 (G)
64	46570	46322	<	249	82	unkanntes Protein Phage CP-933V (<i>E. coli</i>), ähnlich DinI	NP_288640	97 (G)
65	47309	46844	<	466	--	10S tmRNA <i>ssrA</i> (<i>E. coli</i>)	AE000347	99 (G)

ORF	Start Position	Stop Position	Orien- tierung	Länge:		Protein mit ähnlicher Sequenz: Bezeichnung/Herkunft (Bakterium)	Identifikationsnummer	Identität (%)
				ORF (bp)	Protein (as)			
66	47901	47419	<	483	160	kleines Protein B (<i>E. coli</i> K-12)	NP_417110	100 (G)
67	48033	48509	>	477	158	hypothetisches Protein YfjG (<i>E. coli</i> K-12)	NP_417109	99 (G)
68	48481	48789	>	309	102	hypothetisches Protein YfjF (<i>E. coli</i> K-12)	NP_417108	99 (G)
69	49192	48851	<	342	113	kleines Membranprotein A (<i>E. coli</i> CFT073)	NP_755021	100 (G)
70	> 50625	49341	<	>1284	>428	RecN (<i>E. coli</i> K-12)	NP_417106	99 (T)

¹: kein Stopcodon an Position 1 von ORF 1; (G): Identität über gesamte Sequenz; (T): Identität über ein Teil der Sequenz

Tabelle Anlage 2: Sequenzanalyse des 57930 bp umfassenden Genoms des Stx1-konvertierenden Bakteriophagen BP-4795 des *E. coli* O84:H4 Stammes 4795/97.

ORF	Gen	Orientierung	Start Position	Stop Position	Länge:		Protein mit ähnlicher Sequenz:		
					ORF (bp)	Protein (as)	Bezeichnung/Herkunft (Bakterium)	Identifikationsnummer	Identität (%)
1	<i>int</i>	<	1345	59	1287	428	Integrase Phage CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288703	99 (G)
2	<i>xis</i>	<	1633	1379	255	84	Excisionase (<i>E. coli</i>)	NP_311039	100 (G)
3		<	1786	1652	135	44	hypothetisches Phagenprotein (<i>S. flexneri</i>)	NP_837486	90 (T)
4		<	2032	1790	243	80	hypothetisches Protein (<i>E. coli</i>)	NP_311038	86 (G)
5		<	2710	2120	591	196	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049538	35 (T)
6		<	2904	2713	192	63	hypothetisches Protein (<i>E. coli</i>)	NP_309544	93 (G)
7		<	3676	2906	771	256	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049469	99 (G)
8		<	3894	3673	222	73	C4-Typ Zinkfingerprotein (<i>E. coli</i>)	NP_311033	98 (G)
9		<	4274	3993	282	93	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049470	96 (G)
10		<	4476	4285	192	63	unbekanntes Protein Phage CP-933K (<i>E. coli</i>)	NP_286498	96 (G)
11		<	4637	4449	189	62	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049472	95 (G)
12	<i>exo</i>	<	5308	4628	681	226	Exonuclease Phage CP-933K (<i>E. coli</i>)	NP_286499	99 (G)
13	<i>bet</i>	<	6090	5305	786	261	Protein Bet Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049474	99 (G)
14	<i>gam</i>	<	6392	6096	297	98	Wirts-Nuklease Inhibitorprotein Gam Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049475	100 (G)
15	<i>kil</i>	<	6737	6468	270	89	Protein Kil Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049476	100 (G)
16	<i>cIII</i>	<	6744	6580	165	54	Regulatorprotein CIII Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049477	98 (G)
17	<i>ssb</i>	<	7185	6817	369	122	ss-DNA-Bindeprotein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049478	100 (G)
18		<	7806	7336	471	156	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049479	100 (G)
19	<i>N</i>	<	8314	7865	450	149	Antiterminatorprotein N Phage H-19B (<i>E. coli</i>)	AAD04643	100 (G)
20		<	9124	8720	405	134	-----	-----	-----
21		<	9777	9121	657	218	hypothetisches Protein (<i>Bordetella bronchiseptica</i>)	NP_889695	46 (T)
22		<	10061	9774	288	95	Membranprotein (<i>B. bronchiseptica</i>)	NP_889696	45 (T)
23	<i>ci</i>	<	10902	10198	705	234	Repressorprotein CI Phage H-19B (<i>E. coli</i>)	AAD04644	100 (G)
24	<i>cro</i>	>	11016	11249	234	77	Regulatorprotein Cro Phage H-19B (<i>E. coli</i>)	AAD04645	98 (G)
25	<i>cII</i>	>	11388	11684	297	98	Regulatorprotein CII Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049487	98 (G)
26	<i>O</i>	>	11717	12655	939	312	Replikationsprotein O Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049488	99 (G)
27	<i>P</i>	>	12652	13353	702	233	Replikationsprotein P Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049489	99 (G)
28	<i>ren</i>	>	13350	13640	291	96	Protein Ren Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049490	98 (G)
29		>	13711	13989	279	92	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049491	98 (G)
30		>	14158	14583	426	141	hypothetisches Protein Stx2 Phage I (<i>E. coli</i>)	NP_613009	99 (G)
31	<i>ninB</i>	>	14441	14986	546	181	Protein NinB Stx2 Phage I (<i>E. coli</i>)	NP_613010	100 (G)
32	<i>dam</i>	>	14983	15510	528	175	DNA N-6-Adenin-Methyltransferase Dam phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049494	100 (G)

ORF	Gen	Orientierung	Start Position	Stop Position	Länge:		Protein mit ähnlicher Sequenz:		
					ORF (bp)	Protein (aa)	Bezeichnung/Herkunft (Bakterium)	Identifikationsnummer	Identität (%)
33		>	15692	16741	1050	349	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049495	99 (G)
34		>	16725	16880	156	51	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	CAB39295	100 (G)
35	<i>roi</i>	>	16887	17615	729	242	DNA-Bindeprotein Roi Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049496	100 (G)
36	<i>ninG</i>	>	17615	18220	606	201	Protein NinG Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049497	99 (G)
37	<i>ninH</i>	>	18217	18411	195	64	Protein NinH Phage H-19B (<i>E. coli</i>)	O48428	98 (G)
38	<i>Q</i>	>	18404	18838	435	144	Antiterminatorprotein Q Phage H-19B (<i>E. coli</i>)	AAD04655	100 (G)
39		<	19072	18827	246	81	hypothetisches Protein Stx1-Phage (<i>E. coli</i>)	NP_859220	100 (G)
40	<i>stxA₁</i>	>	19345	20292	948	315	Shiga Toxin 1 A-Untereinheit Phage CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288673	100 (G)
41	<i>stxB₁</i>	>	20302	20571	270	89	Shiga Toxin 1 B-Untereinheit Phage CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288672	100 (G)
42		>	20722	20949	228	75	hypothetisches Protein Phage phi-O153 (<i>E. coli</i>)	AAW21760	100 (G)
43	<i>yjhS</i>	>	21071	23008	1938	645	Protein YjhS Phage phi-O153 (<i>E. coli</i>)	AAW21761	99 (G)
44		>	23144	23323	180	59	hypothetisches Protein (<i>E. coli</i>)	CAC05530	100 (G)
45		>	23190	23636	447	148	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049503	96 (G)
46	<i>S</i>	>	23713	23928	216	71	Protein S Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049504	94 (G)
47		>	23933	24277	345	114	hypothetisches Protein (<i>E. coli</i>)	NP_309558	99 (G)
48	<i>R</i>	>	24328	24861	534	177	Protein R Phage H-19B (<i>E. coli</i>)	AAD17382	96 (G)
49	<i>ant</i>	>	25132	25701	570	189	Antirepressorprotein Ant Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049506	100 (G)
50		>	25701	25847	147	48	-----	-----	-----
51	<i>Rz</i>	>	25855	26322	468	155	Endopeptidase Rz Phage CP-933M (<i>E. coli</i>)	NP_286876	99 (G)
52		<	26912	26685	228	75	unbekanntes Protein Phage CP-933P (<i>E. coli</i>)	NP_287985	100 (G)
53		>	26954	27319	366	121	unbekanntes Protein Phage CP-933N (<i>E. coli</i>)	NP_287289	96 (G)
54		>	27610	28173	564	187	Terminase kleine Untereinheit Phage CP-933P (<i>E. coli</i>)	NP_287983	98 (G)
55		>	28170	29831	1662	553	Terminase große Untereinheit Phage CP-933P (<i>E. coli</i>)	NP_287982	98 (G)
56		>	29895	31832	1938	645	Haupt-Kopfprotein/Protease (<i>E. coli</i>)	NP_309999	98 (G)
57		>	31877	32098	222	73	unbekanntes Protein Phage CP-933P (<i>E. coli</i>)	NP_287980	97 (G)
58		>	32044	33408	1365	454	Portal-Protein (<i>E. coli</i>)	NP_310001	92 (G)
59		>	33405	34790	1386	461	hypothetisches Protein (<i>E. coli</i>)	NP_310002	80 (G)
60		>	34787	35113	327	108	unbekanntes Protein Phage CP-933P (<i>E. coli</i>)	NP_287978	99 (G)
61		>	35123	35473	351	116	Kopf-Schwanz Adaptorprotein (<i>E. coli</i>)	NP_309824	100 (G)
62		>	35470	35916	447	148	Strukturkomponente Phage CP-933P (<i>E. coli</i>)	NP_287976	100 (G)
63		>	35913	36257	345	114	Strukturkomponente Phage CP-933P (<i>E. coli</i>)	NP_287975	100 (G)
64		>	36187	37032	846	281	Haupt-Schwanzuntereinheit Phage CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288654	97 (G)
65		>	37038	37412	375	124	Schwanzkonstruktionschaperon (<i>E. coli</i>)	NP_309828	100 (G)
66		>	37436	37717	282	93	unbekanntes Protein Phage CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288652	100 (G)
67		>	37769	41011	3243	1080	Schwanzfaserkomponente Phage CP-933P (<i>E. coli</i>)	NP_287971	98 (G)
68		>	41004	41345	342	113	Kleines Schwanzprotein (<i>E. coli</i>)	NP_310011	99 (G)
69		>	41345	42043	699	232	Schwanzfaserkomponente L Phage CP-1639 (<i>E. coli</i>)	CAH23256	97 (G)

ORF	Gen	Orientierung	Start Position	Stop Position	Länge:		Protein mit ähnlicher Sequenz:		
					ORF (bp)	Protein (aa)	Bezeichnung/Herkunft (Bakterium)	Identifikationsnummer	Identität (%)
70		>	41916	42797	882	293	Schwanzfaserkomponente K Phage CP-933U (<i>E. coli</i>)	NP_288443	96 (G)
71		>	42695	43375	681	226	Schwanzfaserkomponente Phage CP-933V (<i>E. coli</i>)	NP_288647	96 (G)
72		>	43622	47098	3477	1158	Schwanzfaserkomponente J Phage CP-1639 (<i>E. coli</i>)	CAH23259	92 (G)
73	<i>lom</i>	>	47165	47764	600	199	äußeres Membranprotein Lom Phage CP-1639 (<i>E. coli</i>)	CAH23260	97 (G)
74		<	47938	47765	174	57	-----	-----	-----
75		>	47823	49142	1320	439	Schwanzfaserprotein Phage CP-933R (<i>E. coli</i>)	NP_287775	95 (G)
76		>	49024	49413	390	129	hypothetisches Protein Phage 933W (<i>E. coli</i>)	NP_049520	93 (G)
77		>	49504	49830	327	108	Transposase OrfA Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	BAB35113	96 (G)
78		>	49827	50717	891	296	Transposase OrfB Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	BAB35112	100 (G)
79		>	51118	51414	297	98	unbekanntes Protein eines ISEc8 (<i>E. coli</i>)	NP_286743	88 (T)
80		>	51650	52255	606	201	hypothetisches Protein (<i>E. coli</i>)	CAI43897	81 (T)
81		>	52344	52670	327	108	Transposase OrfA Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	BAB35113	97 (G)
82		>	52667	53557	891	296	Transposase OrfB Protein eines IS629 (<i>E. coli</i>)	BAB35112	96 (G)
83	<i>nleA₄₇₉₅</i>	<	55371	53992	1380	459	Typ III Sekretionssystem Effektor Phage CP-933P (<i>E. coli</i>)	NP_287961	86 (G)
84		<	57279	56023	1257	418	Avirulenz A Protein (<i>Pseudomonas syringae</i>)	AAA25725	37 (T)
85	<i>dinI</i>	<	57683	57435	249	82	Protein DinI (<i>S. flexneri</i>)	NP_837734	62 (G)

(G): Identität über gesamte Sequenz; (T): Identität über ein Teil der Sequenz

Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Originalarbeiten

Creuzburg,K., Köhler,B., Hempel,H., Schreier,P., Jacobs,E., and Schmidt,H. (2005). Genetic structure and chromosomal integration site of the cryptic prophage CP-1639 encoding Shiga toxin 1. *Microbiology* 151: 941-950.

Creuzburg,K., Recktenwald,J., Kuhle,V., Herold,S., Hensel,M., and Schmidt,H. (2005). The Shiga toxin 1-converting bacteriophage BP-4795 encodes an NleA-like type III effector protein. *J Bacteriol* 187: 8494-8498.

Creuzburg,K., and Schmidt,H. (2007). Molecular characterization and distribution of genes encoding members of the type III effector NleA family among pathogenic *Escherichia coli*. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Tagungsbeiträge

Hempel,H., Creuzburg,K., Köhler,B., Röske,I., Schmidt,H. (2004). Molecular structure and integration site of the cryptic Stx1-encoding prophage CP-1639. Poster presentation. 56. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Münster (Germany).

Schmidt,H., Hempel,H., Herold,S., Creuzburg,K., Köhler,B. (2004). Genetic structure and chromosomal integration sites of Shiga toxin encoding phages. Poster presentation. The New Phage Biology. ASM Conference. Key Biscane (USA).

Creuzburg,K., Recktenwald,J., Kuhle,V., Herold,S., Hensel,M., Schmidt,H. (2005). Shiga toxin 1 and a type III effector are encoded on a single bacteriophage. Poster presentation. 57. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Göttingen (Germany).

Creuzburg,K., (2006). Distribution of a phage encoded type III effector among pathogenic *Escherichia coli*. Kurzvortrag. Mini-Symposium "Mikrobielle Pathogenität". Bad Urach (Germany).

Creuzburg,K., and Schmidt,H. (2006). Distribution of variants of the type III effector gene *nleA* among enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Poster presentation. 58. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Würzburg (Germany).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt...

...Herrn Prof. Herbert Schmidt für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine engagierte Betreuung und seine mir stets gewährte Unterstützung.

...Herrn Prof. Gerold Barth für die Betreuung innerhalb der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden.

...Herrn Prof. Enno Jacobs für die Möglichkeit der Bearbeitung des Promotions-themas am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene und für die weiterhin gewährte Unterstützung nach meinem Weggang nach Stuttgart.

...Herrn Prof. Michael Hensel für einige hilfreiche Hinweise während der Anfertigung dieser Arbeit.

...insbesondere allen ehemaligen Angehörigen der Arbeitsgruppe EHEC in Dresden.

...allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene in Dresden für das angenehme Arbeitsklima, sowie den Mitarbeitern des Fachgebiets Lebensmittelmikrobiologie in Stuttgart, insbesondere Markus Kranz.

...Frau Gisela Nagler des Instituts für Mikrobiologie in Stuttgart-Hohenheim für die Unterstützung bei einigen Western Blot Analysen.

...der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung.

....meinen Eltern für ihre Unterstützung und stetige Hilfe, auch wenn es nicht immer leicht war.

...meinen Verwandten und Freunden, dass sie immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich erkenne die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften der Technischen Universität Dresden vom 20.03.2000 an.

Dresden, 09.01.2007

Kristina Creuzburg